



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de
Gentianella nitida en un modelo experimental inducido
por paracetamol**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Kelly Nora CARBONEL VILLANUEVA

ASESOR

Silvia SUAREZ CUNZA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Carbonel K. Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Gentianella nitida* en un modelo experimental inducido por paracetamol [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2017.

648
261.
14(2)
83



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina

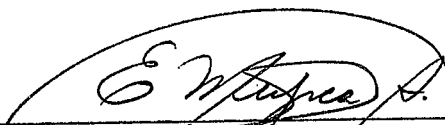


Unidad de Posgrado
Sección Maestría


ACTA DE GRADO DE MAGISTER


En la ciudad de Lima, a los 11 días del mes de mayo del año dos mil diecisiete siendo las 3.00 horas, bajo la presidencia del Dr. Juan Ernesto Denegri Arce con la asistencia de los Profesores: Dra. Elydia Cornelia Mujica Albán (Miembro), Mg. Miguel Hernán Sandoval Vegas (Miembro) Mg. Acela Inés Arnao Salas (Miembro) y la Dra. Silvia Suárez Cunza (Asesora); la postulante al Grado de Magister en Bioquímica, Bachiller en Tecnología Médica, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **"EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE Gentianella nitida EN UN MODELO EXPERIMENTAL INDUCIDO POR PARACETAMOL"** con el fin de optar el Grado Académico de Magister en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **A EXCELENTE 19**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA** a la postulante **KELLY NORA CARBONEL VILLANUEVA**.

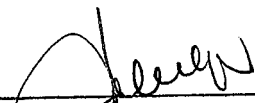
Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo las 16.00 horas, se da por concluido el acto académico de sustentación.


Dra. **Elydia Cornelia Mujica Albán**
Profesora Principal
Miembro


Mg. **Miguel Hernán Sandoval Vegas**
Profesor Principal
Miembro


Mg. **Acela Inés Arnao Salas**
Profesora Invitada
Miembro


Dra. **Silvia Suárez Cunza**
Profesora Principal
Asesora


Dr. **Juan Ernesto Denegri Arce**
Profesor Principal
Presidente

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis adorados padres, por estar siempre a mi lado brindándome sus enseñanzas y cumplir cada meta trazada sin rendirme jamás.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y María Auxiliadora por ser la fortaleza en mi vida.

A mis padres Félix y Nora por su amor y motivación día a día.

A mi hermano José Félix por su ejemplo de perseverancia en sus metas trazadas.

A mi asesora, Dra. Silvia Suárez Cunza por todo el apoyo e incentivo de llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

A mi profesora Mg. Inés Arnao Salas por sus enseñanzas que siempre las tendré presente.

A mis amigos Marcela, Oswaldo, Luis y Valerio que siempre estuvieron apoyándome intelectualmente y brindándome su amistad incondicionalmente.

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto FEDU CON/CON 2011 número 110104051 y fue ejecutado en los laboratorios del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXO	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación problemática.....	1
1.2 Formulación del problema	3
1.3 Justificación de la Investigación	3
1.4 Objetivos	4
1.4.1 Objetivo General	4
1.4.2 Objetivos Específicos.....	4
CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Antecedentes de investigación	5
2.2 Bases Teóricas.....	7
2.2.1 <i>Gentianella nitida</i>	7
2.2.1.1 Taxonomía	8
2.2.1.2 Distribución geográfica	9
2.2.1.3 Composición química	10
2.2.1.4 Nombres comerciales.....	10
2.2.1.5 Usos en la medicina tradicional	11

2.2.2	Paracetamol	11
2.2.2.1	Absorción y metabolismo del paracetamol.....	12
2.2.2.2	Mecanismos de toxicidad del paracetamol	13
2.2.3	Radicales libres	16
2.2.4	Antioxidantes	18
2.2.4.1	Catalasa	18
2.2.4.2	Superóxido dismutasa.....	19
2.2.4.3	Glutación S- transferasa	20
2.2.5	Estrés oxidativo en la salud y enfermedad.....	20
2.2.6	Biomarcadores de estrés oxidativo.....	21
2.2.6.1	Lipoperoxidación.....	21
2.2.6.2	Glutación	22
CAPITULO 3: METODOLOGÍA		25
3.1	Tipo y diseño de investigación:	25
3.2	Materiales y métodos :	25
3.2.1	Reactivos:.....	25
3.2.2	Equipos:	26
3.2.3	Recolección de muestra:	26
3.2.3.1	Secado y molienda:	27
3.2.3.2	Preparación del extracto acuoso de Hercampuri.....	27
3.2.4	Caracterización fisicoquímica.....	28
3.2.4.1	Densidad aparente:.....	28
3.2.4.2	Masa seca o materia seca	28
3.2.4.3	Sólidos solubles	28

3.2.5	Evaluación de la capacidad antioxidante	29
3.2.5.1	Método de DPPH	29
3.2.5.2	Método de ABTS	30
3.2.5.3	Método FRAP	32
3.2.6	Determinación de metabolitos fenólicos	34
3.2.6.1	Fenoles Totales	34
3.2.6.2	Flavonoides	35
3.2.7	Ensayos bioquímicos in vivo	37
3.2.7.1	Modelo experimental para el estudio del efecto hepatoprotector del hercampuri	37
3.2.7.2	Grupos	37
3.2.7.3	Aspectos éticos	38
3.2.7.4	Procesamiento para la obtención de muestra biológica	38
3.2.7.5	Parámetros bioquímicos del estudio experimental	39
3.2.7.5.1	Determinación de Catalasa:	39
3.2.7.5.2	Determinación de Superóxido dismutasa	40
3.2.7.5.3	Determinación de Glutación S-transferasa	41
3.2.7.5.4	Determinación de Glutación reducido:	42
3.2.7.5.5	Determinación de Lipoperoxidación	43
3.2.7.5.6	Determinación de Proteínas totales	44
3.3	Análisis estadísticos	46
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		47
4.1	RESULTADOS	47
4.1.1	Del extracto de <i>Gentianella nitida</i>	47

4.1.1.1	Caracterización fisicoquímica.....	47
4.1.1.2	Evaluación de la capacidad antioxidante	48
4.1.2	Parámetros bioquímicos del estudio experimental.....	52
4.1.2.1	Determinación de la actividad específica de la Catalasa	52
4.1.2.2	Determinación de la actividad específica de la Superóxido dismutasa 53	
4.1.2.3	Determinación de la actividad específica de la Glutación S-transferasa 54	
4.1.2.4	Determinación de los niveles de Glutación reducido	55
4.1.2.5	Determinación de Lipoperoxidación	55
4.1.2.6	Determinación de Proteínas totales.....	56
4.2	DISCUSIÓN	56
	CONCLUSIONES	64
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	ANEXOS	72

ABREVIATURAS

ABTS	ácido 2,2-azinobis-3-etil benzotiazolina-6-sulfónico
APAP	acetaminofén
CYP	citocromo P450
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EROs (ROS)	especies reactivas de oxígeno
FDA	agencia de alimentos y medicamentos
FHP	fármaco hepatoprotector
FRAP	poder antioxidante de la reducción del ión férrico
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
NAPQ1	N-acetil-p-benzoquinoneimina
RL	radicales libres
SOD	superóxido dismutasa
SS	sólido soluble
TBARs	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEAC	capacidad antioxidante equivalente a trolox
UV	ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Vías del metabolismo del paracetamol y su toxicidad.....	13
<i>Figura 2.</i> Mecanismo de acción del citocromo P450.	15
<i>Figura 3.</i> La cadena de transporte de electrones mitocondrial es considerada la mayor fuente de formación de radicales libre.	17
<i>Figura 4.</i> Pasos de la peroxidación lipídica: iniciación, propagación y terminación.	23
<i>Figura 5.</i> Estructura química de las formas de glutatión.....	24
<i>Figura 6.</i> El extracto de <i>Gentianella nitida</i> frente al radical libre estable de DPPH para determinar el IC ₅₀	49
<i>Figura 7.</i> <i>Gentianella nitida</i> frente al radical libre ABTS para determinar el IC ₅₀	50
<i>Figura 8.</i> Capacidad reductora del hierro férrico de <i>Gentianella nitida</i>	50
<i>Figura 9.</i> El Efecto de <i>Gentianella nitida</i> en la actividad de la catalasa en homogenizado de hígado.	53
<i>Figura 10.</i> El Efecto de <i>Gentianella nitida</i> en la actividad de la superóxido dismutasa en homogenizado de hígado.....	53
<i>Figura 11.</i> El Efecto de <i>Gentianella nitida</i> en la actividad de la Glutatión S transferasa en homogenizado de hígado.....	54
<i>Figura 12.</i> El Efecto de <i>Gentianella nitida</i> sobre los niveles de glutatión reducida en homogenizado de hígado.....	55
<i>Figura 13.</i> El Efecto de <i>Gentianella nitida</i> en la lipoperoxidación en homogenizado de hígado.....	55
<i>Figura 14.</i> El Efecto de <i>Gentianella nitida</i> en las proteínas totales en homogenizado de hígado.....	56

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Vida media de las Especies Reactivas de Oxígeno.....	16
<i>Tabla 2.</i> Caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de <i>Gentianella nitida</i>	48
<i>Tabla 3.</i> Capacidad antioxidante del extracto acuoso de <i>Gentianella nitida</i>	51
<i>Tabla 4.</i> Coeficiente de Correlación de Pearson (r) del extracto acuoso de <i>Gentianella nitida</i>	52
<i>Tabla 5.</i> Resultados de la actividades específicas de las enzimas Catalasa y Superóxido dismutasa.....	54

ÍNDICE DE ANEXO

<i>Anexo 1. Planta <i>Gentianella nitida</i>.....</i>	72
<i>Anexo 2. Raíz, tallo y flores de <i>Gentianella nitida</i>.</i>	72
<i>Anexo 3. Clasificación de <i>Gentianella nitida</i>.....</i>	73
<i>Anexo 4. Constancia de depósito del material vegetal.</i>	74
<i>Anexo 5. Preparación del extracto acuoso de <i>Gentianella nitida</i>.....</i>	75
<i>Anexo 6. Ácido ascórbico estándar en la curva de calibración en el método DPPH.</i>	76
<i>Anexo 7. Curva de calibración del Trolox en el método de ABTS.....</i>	76
<i>Anexo 8. Método de FRAP con la curva de calibración del FeSO₄</i>	77
<i>Anexo 9. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales con ácido gálico.</i>	77
<i>Anexo 10. Curva de calibración de quercetina para cuantificación de flavonoides.</i>	78
<i>Anexo 11. Correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH.</i>	78
<i>Anexo 12. Correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de ABTS.</i>	79
<i>Anexo 13. El coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH.</i>	79
<i>Anexo 14. El coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de ABTS.</i>	80
<i>Anexo 15. Correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de FRAP.....</i>	80
<i>Anexo 16. El coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de FRAP.....</i>	81

<i>Anexo 17. Determinación de la actividad específica de la superóxido dismutasa: diferencia entre las medianas por prueba Post hoc Mann Whitney.</i>	<i>81</i>
<i>Anexo 18. Determinación de la actividad específica de la Glutación S-transferasa: diferencia entre las medianas por prueba Post hoc Mann Whitney.</i>	<i>82</i>
<i>Anexo 19. Determinación de los niveles de glutación reducido: diferencia entre las medianas por prueba Post hoc Mann Whitney.....</i>	<i>82</i>
<i>Anexo 20. Determinación de lipoperoxidación: diferencia entre las medianas por prueba Post hoc Mann Whitney.</i>	<i>83</i>

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Gentianella nitida* (hercampuri) en un modelo experimental inducido por paracetamol. Para evaluar el efecto de hepatoprotección del extracto de *Gentianella nitida* se empleó paracetamol como inductor del daño hepático. Se analizó *in vitro* la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP), el contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto acuoso de *Gentianella nitida*. En el modelo *in vivo* se trabajó con 24 ratas Holtzman hembras de 2 meses, formándose 4 grupos (n= 6): grupo control, grupo paracetamol, grupo silimarina y grupo *Gentianella nitida*. Al grupo *Gentianella nitida* se administró una dosis de 200 mg/kg de peso corporal durante 7 días, seguido del paracetamol 300 mg/kg de peso corporal por 4 días más. Se utilizó silimarina 50 mg/kg de peso como estándar de referencia. En el homogenizado de hígado se midió catalasa, superóxido dismutasa, glutatión S- transferasa, glutatión, TBARs, proteínas totales. En el análisis estadístico se aplicó prueba Kruskal-Wallis, y como prueba pos hoc Mann Whitney. Se trabajó con una significancia $p < 0,05$. La capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico (AAEAC-DPPH) fue 56 $\mu\text{g AA/mg ss}$ y la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC-ABTS) fue 87,7 $\mu\text{g trolox/mg ss}$. Expresado en FRAP fue 98,5 $\mu\text{g FeSO}_4/\text{mg ss}$. Fenoles totales fue 65,8 $\mu\text{g EAG/mg ss}$ y de flavonoides, 11,7 $\mu\text{g EQ/mg ss}$. En el modelo *in vivo*, el grupo *Gentianella nitida* tuvo resultados significativos en la actividad de SOD y TBARs (aumento; $p < 0,05$) y en la actividad de glutatión S-transferasa y glutatión (disminución; $p < 0,05$). El extracto de *Gentianella nitida* exhibe capacidad antioxidante en correlación con el contenido de fenoles totales, protegiendo la actividad de las enzimas antioxidantes hepáticas frente al daño de las ROS producidas por el paracetamol.

Palabras Clave: *Gentianella*, antioxidantes, fenoles, flavonoides, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión transferasa, glutatión, TBARs, proteínas, acetaminofén.

ABSTRACT

The aim of this investigation was to evaluate the hepatoprotective effect of the aqueous extract of *Gentianella nitida* (hercampuri) in an experimental model induced by paracetamol. To evaluate the hepatoprotective effect of extract of *Gentianella nitida*, paracetamol was used as an inducer of liver damage. The antioxidant capacity was analyzed in vitro (DPPH, ABTS, FRAP), the total content of phenols and flavonoids in the aqueous extract of *Gentianella nitida*. In the in vivo model, 24 female Holtzman rats of 2 months old were studied, forming 4 groups (n = 6): control group, paracetamol group, silymarin group and *Gentianella nitida* group. A dose of 200 mg / kg body weight was given to the *Gentianella nitida* group for 7 days, followed by paracetamol 300 mg / kg body weight for 4 days. Silymarin 50 mg / kg body weight was used as the reference standard. In the liver homogenate was measured catalase, superoxide dismutase, glutathione S-transferase, glutathione, TBARs, total proteins. In the statistical analysis was applied Kruskal-Wallis test and as a post hoc test Mann Whitney. A significance of $p < 0.05$ was used. The antioxidant capacity equivalent to the ascorbic acid (AAEAC-DPPH) was 56 ug AA/mg ss and the antioxidant capacity equivalent to the trolox (TEAC-ABTS) was 87,7 μg trolox/mg ss. Expressed in FRAP was 98,5 μg FeSO₄/mg ss. Total phenols were 65,8 ug EAG/mg ss and flavonoids were 11,7 ug EQ/mg ss. In the in vivo model, the *Gentianella nitida* group had significant results in SOD and TBARs (increase: $p < 0.05$) and in glutathione S-transferase activity and glutathione (decrease: $p < 0.05$). The extract of *Gentianella nitida* shows an antioxidant capacity in correlation with total phenol content, protecting the activity of liver antioxidant enzymes against the damage of ROS produced by paracetamol.

Key words: *Gentianella*, antioxidant, phenols, flavonoids, catalase, superoxide dismutase, glutathione transferases, glutathione, TBARs, protein, acetaminophen.

1 CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

Desde la antigüedad 3500 a 2500 años antes de Cristo se conoce los beneficios de las plantas medicinales para la salud (Agapito & Sung, 1998), estas constituían el único recurso que disponía el hombre para curarse, a pesar de todos los conocimientos actuales sobre tratamientos terapéuticos con fármacos de síntesis, el uso de estas plantas medicinales sigue siendo un medio importante para el tratamiento de males a nivel mundial. Esta situación ha llevado a la necesidad de estudiarlas aplicando el método científico con el fin respaldar el conocimiento ancestral de sus propiedades medicinales así como investigar nuevas aplicaciones.

El uso de estos recursos constituyen parte de la medicina tradicional y basado en el amplio uso a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud ha desarrollado

directrices para utilizar de manera segura y proteger las plantas medicinales con el fin de que se utilicen de manera sustentable (Organizacion Mundial de la Salud, 2013).

Los estudios científicos de las plantas medicinales aún son escasos y todavía no se conocen todas las propiedades que poseen cada una de ellas (Agapito & Sung, 1998). A nivel nacional, a pesar de la riqueza y diversidad en recursos fitoterapéuticos las investigaciones científicas sobre su caracterización y acciones bioquímicas son muy escasas.

En el Perú, uno de estos recursos es el hercampuri que abarca a dos especies, *Gentianella alborosea* y *Gentianella nitida*. En la medicina popular se conoce que el hercampuri es usado para aliviar dolores estomacales, combatir las fiebres producidas por el paludismo, remedio para la hepatitis, hepatoprotectora, desintoxicante, depurativo, hipoglucemiante, diurética, regulador de la presión sanguínea, para el tratamiento de la obesidad e hipocolésterolémico (Instituto Nacional de Salud). La mayor parte de los estudios se ha realizado en *Gentianella alborosea*, sin embargo no se ha demostrado científicamente si *Gentianella nitida* comparte estas propiedades como la hepatoprotección.

La automedicación es una expresión del autocuidado del hombre por su salud, sin embargo puede llevar a situaciones negativas, igualmente la polifarmacia a veces producto de una escasa comunicación entre médicos especialistas puede conducir a un daño hepático.

La hepatotoxicidad puede ser leve o grave dependiendo de la dosificación, del tiempo de tratamiento, de la existencia de alguna enfermedad hepática previa o por consumo de bebidas alcohólicas. Uno de los medicamentos hepatotóxicos más usados y de venta libre es el acetaminofén (paracetamol) que puede causar insuficiencia hepática de diversos grados.

Es necesario entonces validar a nivel preclínico in vivo, el uso tradicional de *Gentianella nitida* como un recurso hepatoprotector en un modelo experimental en ratas inducido por paracetamol.

1.2 Formulación del problema

¿El extracto acuoso de *Gentianella nitida* ejerce efecto hepatoprotector en un modelo experimental inducido por paracetamol?

1.3 Justificación de la Investigación

Gentianella nitida es una planta silvestre originaria de la Sierra Peruana, recomendada por los hierberos por sus propiedades como hepatoprotector, reductor de colesterol, diurético y desintoxicante. Estos usos tradicionales requieren ser validados para una potencial aplicación como producto fitoterapéutico y para ser administrado con seguridad y eficacia.

Los estudios científicos constituyen el respaldo para garantizar su consumo como una alternativa a la medicina occidental y los resultados del estudio de hepatoprotección de *Gentianella nitida* beneficiará a la población usuaria.

Igualmente los resultados de esta investigación serán importantes para promover su cultivo y dejar la condición de silvestre, además de velar por la no extinción de esta especie, conservando sus principios activos en cantidad y calidad.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Gentianella nitida* en un modelo experimental inducido por paracetamol.

1.4.2 Objetivos Específicos

Determinar el potencial antioxidante in vitro del extracto acuoso *Gentianella nitida*.

Medir la actividad específica de enzimas antioxidantes hepáticas en un modelo de toxicidad inducido por paracetamol.

Determinar los niveles de metabolitos hepáticos de estrés oxidativo en un modelo de toxicidad inducido por paracetamol.

2 CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de investigación

A nivel nacional son escasos los estudios realizados sin embargo se han llevado a cabo los siguientes: un estudio experimental durante 7 semanas en ratas Sprague-Dawley con la especie *Gentianella alborosea*, en el que se halló la disminución de peso y heces esteatorreicas, haciendo suponer que el efecto era una disminución del proceso de absorción de lípidos a nivel de lumen intestinal, también se observó que no hubo cambios en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima que contribuye a la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Sin embargo se encontró depleción de la reserva de la vitamina A en el tejido hepático aún cuando los niveles séricos se conservaron, evento que puede reforzar su acción inhibitoria de la absorción de lípidos cuando es consumido por tiempo prolongado. (Benavides Rivera, 1998).

Los estudios con *Gentianella nitida* reportados en la literatura no incluyen el efecto hepatoprotector, pero si la actividad antimicrobiana y captación de radicales libres de *Gentianella nitida*, demostrando actividad antifúngica siendo los microorganismos más susceptibles *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum gypseum*. (Rojas, Doroteo, Bustamante, Bauer, & Lock, 2004).

Estudios más recientes con *Gentianella alborosea* mostraron que la esteatosis hepática no alcohólica inducida previamente con una dieta hiperlipídica bajo tratamiento con extracto etanólico de quien produjo una disminución de la macrovacuolas hepáticas observada por tinción con hematoxilina-eosina, aun cuando no mostraron cambios en el peso del hígado ni en el peso de las ratas. (Ugaz Soto, Zafra Tanaka, & Tapia Vicente, 2012)

Otro estudio compara el efecto hipoglucemiante de *Gentianella bicolor* (Corpus huay), *Gentianella nitida* (Hercampuri) y *Gentianella chamuchui* (Genciana) determinándose los niveles de glucosa a las: 03, 06 y 24 horas después de la administración oral de los extractos acuosos de cada planta. En el día 14 se observó una disminución de la glucemia principalmente con *Gentianella bicolor*. (Bermúdez Díaz & Huamán Saavedra, 2015).

Sin embargo los efectos hepatoprotectores de otras plantas medicinales han sido demostrados con diferentes modelos de hepatotoxicidad. Así, el efecto hepatoprotector significativo del extracto metanólico de *Achyranthes aspera linn.* se demostró frente a un modelo experimental de hepatotoxicidad en ratas inducido con una suspensión de rifampicina 5% y una dosis de 100 mg/kg del extracto metanólico (Bafna & Mishra, 2004).

Troncoso & Guija en el año 2007 estudiaron el efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) a la dosis de 150 mg/kg en ratas bajo intoxicación hepática por paracetamol (200 mg/kg) y comparado con un fármaco hepatoprotector (FHP) Purinor® (50 mg/kg). El resultado histopatológico mostró necrosis hepática leve

en el grupo tratado con *Petroselinum sativum* frente a la necrosis de moderada a severa en el grupo de FHP.

Sandoval, Lazarte, & Arnao en el año 2008 determinaron la capacidad hepatoprotectora de las semillas y cáscaras de la uva *Vitis vinifera* L., en un modelo de intoxicación con etanol al 5% en ratones albinos machos durante 7 días. La intoxicación alcohólica produjo hepatomegalia desde las 24 horas, la administración cáscara – semilla con el alimento mostró un daño menor, protegiendo al tejido hepático, hasta el quinto día de injuria.

Arnao Salas, Suárez Cunza, Trabuco Ricaldi, Cisneros Chinchay, & Rodrigo Rojas en el año 2012 estudiaron el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Smilax sonchifolius* (yacón) induciendo intoxicación con acetaminofén en un modelo con ratas hembras albinas Holtzman. En este modelo se realizó un tratamiento previo con el extracto de yacón durante cinco días y la intoxicación hepática se realizó con acetaminofén (250 mg/kg) en una sola dosis. Se empleó como fármaco de referencia silimarina 50 mg/kg peso. Los autores concluyen que el extracto acuoso de hojas de yacón presentó una acción hepatoprotectora comparable a la silimarina.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 *Gentianella nitida*

El género *Gentianella* fue segregado como género por Moench en 1794, hay diferencias notables entre el género *Gentianella* y *Gentiana*. Sin embargo hasta los años 1960 era muy difícil llegar a saber cuántas especies pertenecían a este género de *Gentianella*, ya

que muchas figuraban como *Gentiana*. Tal vez el lugar más rico del género *Gentianella* es la zona Andina de América del Sur (Fabris, 1960).

Las especies *Gentianella alborosea* y *Gentianella nitida* son las más conocidas del género *Gentianella*, éstas especies son muy utilizadas en la medicina tradicional en el Perú principalmente como depurativas hepáticas, hipoglicemiante, hipocolesterolémica, colerética y colagoga. (Villavicencio Vargas, 2001)

Gentianella nitida (Griseb.) Fabris comúnmente también conocido como “Hercampuri” es una planta herbácea tropical encontrada en los Andes (Perú) a 4000 m.s.n.m. es una hierba perenne, algo cespitosa de hasta 4 cm de alto (anexo 1 y 2). Hojas lineales o lineal lanceoladas, agudas en el ápice, de 1.5 - 2 cm de largo y 2 - 3 cm de ancho, muy lustrosas. Flores solitarias cortamente pedunculadas, erectas de color rosado a rojo. Fruto cápsula con numerosas semillas. (Corporación Andina de Fomento, 2012)

Su nombre proviene de la palabra quechua “Hjircan pureck” que significa “el que camina de pueblo en pueblo”.

2.2.1.1 Taxonomía

En el Perú la familia Gentianaceae es reconocida por presentar alrededor de 15 géneros y aproximadamente de 170 especies mayormente hierbas y arbustos. Se reconoce 103 especies endémicas en siete géneros, sólo 33 especies endémicas se encuentran dentro de áreas protegidas. Los géneros de *Gentianella* y *Macrocarpaea* tienen el mayor número de especies endémicas. (Castillo, Salinas, León, & Sánchez, 2006).

Gentianella nitida (Grisebach) Fabris, fue erróneamente identificada como *Gentianella alborosea* (Glig.) Fabris (Lacaille Dubois, Galle, & Wagner, 1996).

Actualmente *Gentianella nitida* (Griseb.) Fabris tiene la siguiente taxonomía, según el Sistema de Clasificación de Croquist (1988) que fue dada por el Museo de Historia Natural (anexo 3).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: GENTIANALES

FAMILIA: GENTIANACEAE

GENERO: *Gentianella*

ESPECIE: *Gentianella nitida* (Griseb.) Fabris

2.2.1.2 Distribución geográfica

Gentianella nitida (Grisebach) Fabris crece en forma silvestre en lugares con humedales en los departamentos de La Libertad, Huánuco, Junín y Huancavelica. Estos ambientes están afectados por la expansión de la actividad minera y el pastoreo intensivo. Las especies endémicas ocupan principalmente las regiones de la puna húmeda y seca, páramo y bosque montano muy húmedo, entre los 1000 y 5100 m de altitud. Sus poblaciones también están siendo explotadas, por considerársele medicinal. (Castillo, Salinas, León, & Sánchez, 2006)

2.2.1.3 Composición química

En muchas especies de la familia Gentianaceae se han aislado secoiridoides y xantonas. Las xantonas se encuentran en la raíz, hojas y tallo, las cuales son de especial interés por ser fuertes inhibidores de la monoamino oxidasa, es decir, son compuestos fisiológicamente activos. En *Gentianella alborosea* se encuentra diversos derivados de las xantonas (Instituto Nacional de Salud).

En *Gentianella nitida* se han identificado 12 metabolitos por HPLC-UV, entre ellos: secologanosida, amaroswerina, amarogentina (secoiridoides), isorientina (c- glicosil flavona), mangiferina, demetilbellidifolina 8-O-glucosido, norswertianina 1-O-glucósido, swertianina 1-O-primeverosido, swertianina 8-O-glucósido, norswertianina, demetilbellidifolina, y swertianina (xantona en forma libre y en forma de glicósidos). (Lacaille Dubois, Galle, & Wagner, 1996). Dos sesterterpenoides fueron aislados, la nistidasina en el año 1997 y el nitiol en el año 1999. (Kawahara, Nozawa, Kurata, Hakamatsuka, Sekita, & Satake, 1999). En otro estudio se aislaron de *Gentianella nitida* xantonas: gentisina y gentiseína por HPLC. (Callo C, Lock, Alvarez, & Jurupe Ch, 2001). Otro metabolito secundario fue aislado como glucósido de secoiridoides es la amaronitidina (Kawahara, Masuda, Sekita, & Satake, 2001).

2.2.1.4 Nombres comerciales

Hercampuri, hircampuri, hilcampure, té amargo, té de Chavín.

2.2.1.5 Usos en la medicina tradicional

La planta entera (raíz, tallo, hojas y flores) de *Gentianella nitida* es usada en la medicina tradicional peruana para la hepatitis, como colagogo y en el tratamiento de la obesidad (Lacaille Dubois, Galle, & Wagner, 1996).

Otros usos son para el tratamiento de dolores estomacales y de fiebre amarilla; tiene propiedades: hepatoprotectora, desintoxicante, depurativa, de acción hipoglucemiante y diurética. También es usado para regular la presión sanguínea, regular la circulación, reducir el peso corporal y el colesterol, actuando como hipocolesterolémico y contra la obesidad. (Hercampuri_Vademecum INS)

2.2.2 Paracetamol

Conocido también como acetaminofén (N-acetil-p-aminofenol [APAP]), ambos términos se mencionarán en el presente trabajo, es un metabolito de la fenacetina, fue utilizado clínicamente por Von Mering en 1893, no apareció en el mercado hasta el año 1950 en los Estados Unidos y en 1956 en Australia. El paracetamol por sus efectivas propiedades analgésica y antipirética es de consumo masivo debido a su libre comercialización sin prescripción médica. Sin embargo desde los años 60 en que se publicaron los primeros casos de intoxicación hasta la actualidad, el interés por los estudios toxicológicos ha mostrado efectos principalmente a nivel hepático de manera que se le emplea como sustancia inductora de hepatotoxicidad en modelos experimentales.

Basados en la literatura disponible, la FDA en Estados Unidos ha determinado que el acetaminofén es efectivo a una dosis terapéutica máxima para adultos 4 gramos en 24 horas. No es recomendable su uso por más de 7 días.

2.2.2.1 Absorción y metabolismo del paracetamol

Su absorción en el tubo digestivo alcanza una concentración máxima a los 30 - 60 minutos; su vida media es de 2 horas; se distribuye uniformemente en los líquidos corporales. (Sisamón, 2003)

El paracetamol (acetaminofén) es metabolizado a conjugado glucurónido y conjugado de sulfato no tóxicos, y también a un metabolito muy reactivo, *N*-acetil-*p*-benzoquinoneimina (NAPQ1); la enzima glucurononiltransferasa (UDP) cataliza las reacciones de conjugación del ácido glucurónido, la familia de enzimas sulfotransferasas catalizan las reacciones de sulfatación y las isoformas del Citocromo P450 biotransforman el APAP a NAPQ1, a éste se le conoce como un compuesto intermedio biológicamente reactivo (figura 1). En dosis terapéuticas, la NAPQ1 se une al glutatión; sin embargo, en caso de dosis excesiva se produce la depleción del glutatión y el NAPQ1 se une a macromoléculas celulares nucleófilas desencadenándose necrosis hepática. (Brunton, Chabner, & Knollman, 2012)

2.2.2.2 Mecanismos de toxicidad del paracetamol

El acetaminofén presenta efectos de toxicidad en dosis elevadas, llegando a causar necrosis en los hepatocitos principalmente en la región centrolobulillar, correspondiente a la zona III del acino hepático de Rappaport. (Sisamón, 2003)

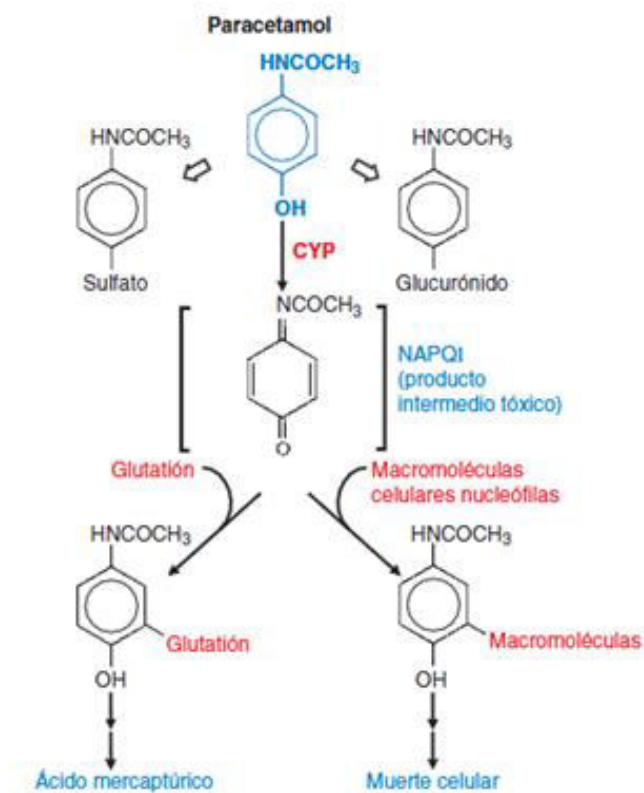


Figura 1. Vías del metabolismo del paracetamol y su toxicidad. El compuesto intermedio tóxico NAPQ1 es N-acetil-p-benzoquinoneimina. Fuente. Datos tomados de Brunton, Chabner, & Knollman (2012).

La detoxificación hepática del acetaminofén cuando se ingiere grandes dosis se produce principalmente a nivel de fase I del metabolismo de xenobióticos. A este nivel el citocromo P450 (CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A) genera el compuesto NAPQI que al reaccionar con el glutatión puede agotar las reservas hepáticas de este tripéptido. El NAPQI también ejerce su toxicidad al unirse de forma covalente a macromoléculas y produciendo radicales libres, que conduce a necrosis hepática en corto tiempo (aprox. 12 horas). En los riñones también se da este proceso pero en mucha menor medida y contribuye en la nefrotoxicidad. Es mayor la toxicidad cuando se asocian inductores del citocromo P450 (etanol -CYP2E y CYP3A -, fenobarbital -CYP2B y CYP3A-, carbamacepina, fenitoína, rifampicina, zidovudina) o también con aquellos que compiten en la conjugación (dicumarol, morfina, prednisona, salicilatos, estrógenos) aumentando así la formación de sustancias químicas tóxicas.

Hay otros factores que predisponen la toxicidad por acetaminofén, es el consumo crónico de alcohol, esto altera el metabolismo del paracetamol, primero agotando las reservas de glutatión por lo tanto disminuye la capacidad de detoxificación del NAPQI, y segundo es un inductor del citocromo P450 incrementada la transcripción de este grupo enzimático, aumenta la proporción de la droga que es convertida en NAPQI. (Sisamón, 2003).

La fase I de la detoxificación del paracetamol a nivel del citocromo P450 produce especies radicales del oxígeno del tipo superóxido y peróxido de hidrógeno. El radical libre superóxido reacciona rápidamente en el medio de formación y el peróxido de hidrógeno por ser una molécula simétrica y de bajo peso molecular puede atravesar membranas y potencialmente provocar daños oxidativos además en otros ambientes de la célula (figura 2).

En la fase 2 participan una serie de enzimas que catalizan reacciones de conjugación, que permiten aumentar la solubilidad de los xenobióticos con el fin de ser excretados por vía urinaria o por heces principalmente. Las conjugaciones incluyen reacción de

sulfatación, glucuronidación, metilación, acetilación, conjugación con el glutatión y conjugación con glicina.

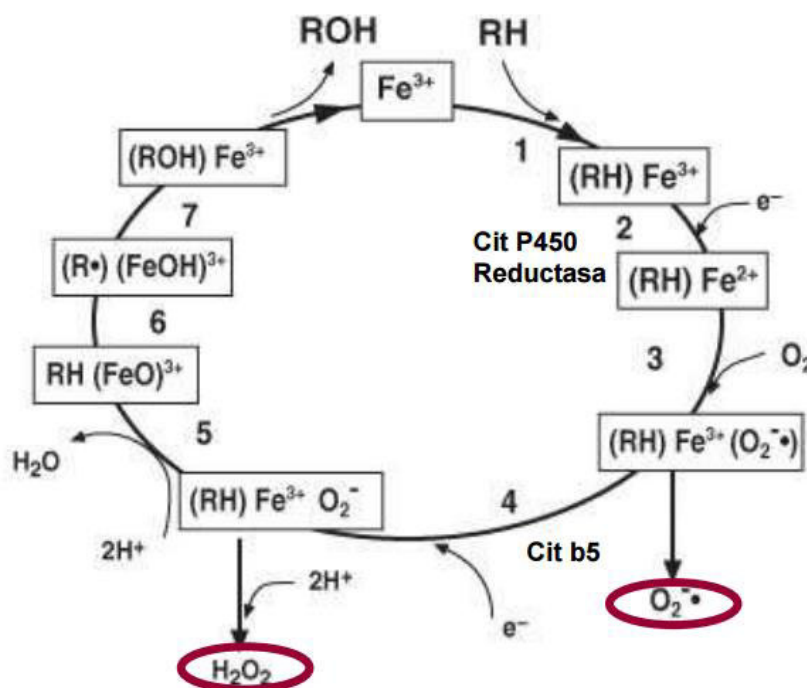


Figura 2. Mecanismo de acción del citocromo P450. Este esquema es una simplificación del mecanismo de acción del citocromo P450 (CYP) propuesto por Coon. En él, el Fe^{3+} representa al hierro del grupo hemo del CYP oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Fuente. Datos tomados de Orellana & Guajardo (2004).

Otros modelos químicos de daño hepático empleados experimentalmente se realizan con tetracloruro de carbono, galactosamina, tioacetamida, concavalina A, lipopolisacárido y azoximetano. (Tuñón, Álvarez, Culebras, & González-Gallego, 2007)

2.2.3 Radicales libres (RL)

Se define como especies químicas (molécula, ion) que contienen un electrón desapareado dentro de su estructura. En la mayor parte de los casos, son especies altamente reactivas en los sistemas biológicos, algunos tienen un tiempo de vida media menor de 1 μ s, y reaccionan para generar moléculas más estables (tabla 1).

Tabla 1. Vida media de las Especies Reactivas de Oxígeno

NOMBRE DE LA ESPECIE	SÍMBOLO	VIDA MEDIA (s)
Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	10^{-5}
Anión superóxido	O_2^-	< 1
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	10^{-9}
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	< 1
Alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	10^{-6}
Peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	7

Fuente. Datos tomados de Gambini (2007).

Las reacciones en las que participa el O_2 suelen originar radicales libres y moléculas reactivas denominadas especies reactivas de oxígeno (EROs): anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. (Konigsberg Fainstein, 2008).

Las EROs anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son reducidas enzimáticamente por metaloenzimas mitocondriales y citosólicas (figura 3). Sin embargo no se dispone de una reducción enzimática del radical libre hidroxilo, probablemente porque su tiempo de vida media es muy corto. Este radical reacciona con moléculas que se encuentran en el medio donde se forma o puede reaccionar con moléculas antioxidantes.

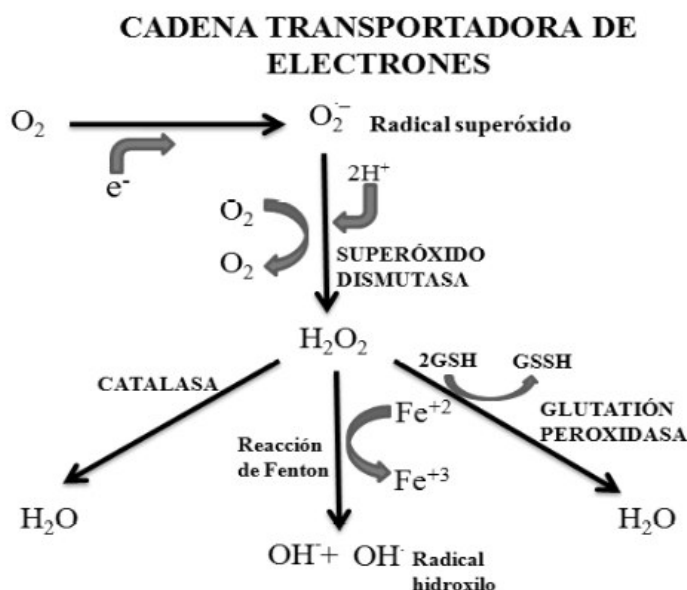


Figura 3. La cadena de transporte de electrones mitocondrial es considerada la mayor fuente de formación de radicales libre. Del total del oxígeno que llega a la mitocondria, del 5 al 10% se reduce por la acción de los electrones procedentes de los transportadores de la cadena respiratoria que escapan de ésta, la cual es responsable de la formación del anión $O_2^{\bullet -}$, que por acción de la SOD se convierte en H_2O_2 y éste a $\bullet OH$ mediante la reacción de Fenton. Fuente. Datos tomados de Maldonado Saavedra, Jimenez Vásquez, Guapillo Vargas, Ceballos Reyes, & Méndez Bolaina (2010).

2.2.4 Antioxidantes

“Un antioxidantes es cualquier substancia que, cuando se encuentra presente en concentraciones pequeñas en relación con las de un sustrato oxidable, demora significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato” según Halliwell (1997). La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres cuando la transferencia es univalente dando inicio a reacciones en cadena que potencialmente dañan a las células.

Los antioxidantes terminan estas reacciones eliminando intermediarios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos.

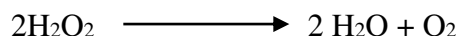
Existen diversas clasificaciones de los antioxidantes, uno de ellos es de acuerdo a su estructura y función biológica: a) enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc) y b) no enzimáticos (glutatión reducido, α -tocoferol, ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina, vitaminas y polifenoles) (Konigsberg Fainstein, 2008).

2.2.4.1 Catalasa (E.C 1.11.1.6):

Es una hemoproteína, cataliza la descomposición del peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. La catalasa se localiza a nivel celular en peroxisoma, mitocondria y citosol; encontrándose en mayor concentración en hígado, riñón y eritrocitos. Su función es eliminar las concentraciones elevadas del H_2O_2 que se forma, como por ejemplo, en la

mitocondria, lo encontramos como producto de la dismutación enzimática del radical libre anión superóxido.

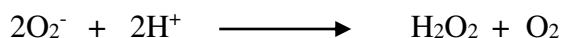
La reacción es la siguiente:



Una molécula de la enzima cataliza la transformación de 1×10^7 moléculas de sustrato por segundo por sitio activo. La catalasa, además de mantener el H_2O_2 en niveles no tóxicos, puede participar en muchos eventos del desarrollo de los seres vivos como la proliferación, diferenciación y muerte celular. (Konigsberg Fainstein, 2008)

2.2.4.2 Superóxido dismutasa (E.C 1.15.1.1) :

Esta enzima se encarga de transformar el radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Las SOD son una familia de enzimas que catalizan la dismutación del O_2^- , como se observa en la siguiente reacción:



SOD 1: es dimérica, su centro catalítico tiene un cobre y un zinc y está en el citoplasma.

SOD 2: es tetramérica, en su centro catalítico tiene un manganeso y se encuentra cerca de la membrana mitocondrial interna

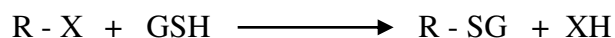
SOD 3: es tetramérica, su centro catalítico también tiene un cobre y un zinc, se encuentra ubicada en la matriz extracelular. (Konigsberg Fainstein, 2008)

La superoxido dismutasa tiene un K_m $3,6 \times 10^{-4}\text{M}$ (Voet & Voet, 2004).

2.2.4.3 Glutación S- transferasa (E.C 2.5.1.18):

Es una familia de enzimas que se encuentran en el citosol, mitocondrias y membranas celulares que catalizan una serie de reacciones que son importantes en el mecanismo de desintoxicación fisiológica. El amplio rango de sustratos de esta enzima permite proteger la célula mediante la conjugación con el glutatión (GSH) a sustratos electrofílicos, generando compuestos menos reactivos y más solubles, que puedan ser eliminados fácilmente de la célula a través de los transportadores de membrana específicos. Se clasifican en tres superfamilias: citosólica, mitocondrial y MAPEG (Proteínas asociada a membrana en eicosanoides y metabolismo glutatión).

En la reacción siguiente la GST cataliza la conjugación de glutatión reducido al centro electrofílico del sustrato produciendo un conjugado GSH estable y soluble:



2.2.5 Estrés oxidativo en la salud y enfermedad

Se define estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes causado por un aumento de oxidantes y/o por una disminución de antioxidantes.

En la actualidad se ha relacionado el estrés oxidativo con procesos fisiológicos como el envejecimiento y enfermedades tales como: aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer,

diabetes mellitus, lupus, el proceso isquemia/reperfusión, procesos inflamatorios y diversos tipos de cáncer, entre otros; ya que el aumento de las especies reactivas y los radicales libres pueden favorecer la presencia de estas enfermedades, y esto se puede prevenir con un equilibrio entre el estado prooxidante y los niveles de antioxidantes.

La alimentación juega un papel muy importante para este equilibrio y puede prevenir estas enfermedades relacionadas al estrés oxidativo; los carotenoides, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, los compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos ayudan a contrarrestar a estos oxidantes.

El uso terapéutico de medicamentos también puede producir intoxicaciones por sobredosis accidental y también voluntaria como en los casos de suicidio u homicidio. El sistema de detoxificación de los fármacos en situaciones de intensa actividad produce en fase I dos ROS, el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (figura 2), los cuales pueden condicionar un ambiente que lleve al estrés oxidativo. Esto se produce principalmente en el hígado, y a nivel celular como tisular puede llevar a una hepatotoxicidad y necrosis hepatocelular.

2.2.6 Biomarcadores de estrés oxidativo:

2.2.6.1 Lipoperoxidación: (TBARs)

Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena liberando Malondialdehído (MDA). Los lípidos son fácilmente oxidados y la reacción una vez iniciada se propaga en cadena.

La lipoperoxidación se divide en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. Etapa Iniciación: se desencadena cuando una especie reactiva de oxígeno ataca a un residuo de un ácido graso poliinsaturado de los lípidos de membrana, este es capaz de retirar un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. Etapa Propagación: se da a partir de la nueva molécula a la que se le ha abstraído un hidrógeno, pasando lo mismo a lo que fue sujeto ella, dándose así una reacción en cadena y de esta manera la lipoperoxidación se propaga a través de la membrana. Etapa Terminación: puede finalizar cuando un radical lipídico reacciona con otra molécula radical para formar un dímero que queda dentro de la membrana (figura 4). La lipoperoxidación altera las funciones de fluidez y permeabilidad de la membrana. (Konigsberg Fainstein, 2008)

2.2.6.2 Glutación

En 1921 fue propuesto como un dipéptido y se introdujo el nombre de Glutación por Hopkins, en 1935 finalmente se describe la estructura química como un tripéptido por Harringy Mead. El glutación (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) es un metabolito hidrosoluble sintetizado en el citoplasma de todas las células, encontrándose en mayor concentración en el hígado, ya que este órgano tiene la función de eliminar compuesto xenobióticos. (Denzoin Vulcano, Soraci, & Tapia, 2013)

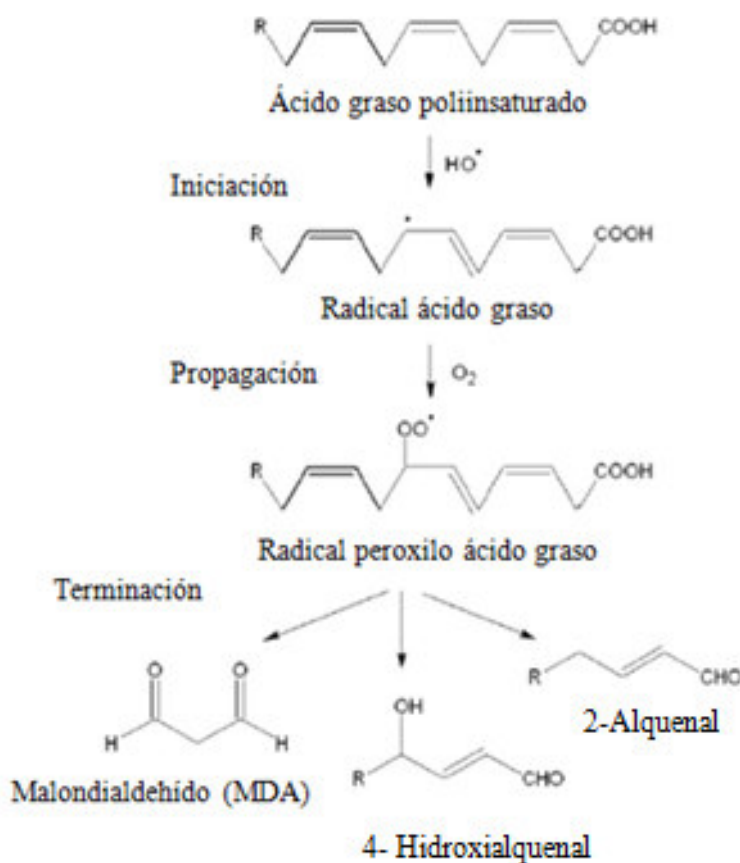


Figura 4. Pasos de la peroxidación lipídica: iniciación, propagación y terminación.

Fuente. Datos tomados de Mimica Dukic, y otros, (2012).

Una vez sintetizado, la mayor parte es transportado al espacio extracelular, donde es catabolizado rápidamente. El glutatión participa en muchos procesos fisiológicos como: antioxidante participando en la detoxificación de xenobióticos; es cofactor para las reacciones de isomerización; modula actividades enzimáticas; también como almacenamiento y transporte de cisteína; proliferación celular y en la apoptosis; y la

función más importante es mantener el balance de óxido-reducción en la célula protegiéndola del estrés oxidativo. (Martínez Sámano, Torres Durán, & Juárez Oropeza, 2011)

En la detoxificación de los xenobióticos el glutatión forma conjugados con los compuestos electrofílicos en reacciones espontáneas, y también en reacciones enzimáticas catalizadas por la GSH S-transferasa, glutatión peroxidasa.

Ante reacciones peroxidativas el GSH se oxida a GSSG formándose un puente disulfuro (figura 5), cuando participa como cosustrato de la glutatión peroxidasa, enzima que cataliza las reducciones de los compuestos peroxidados. El GSSG es reducido a GSH por medio del enzima glutatión reductasa, esta enzima tiene como cofactor NADPH, que será proporcionado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa.

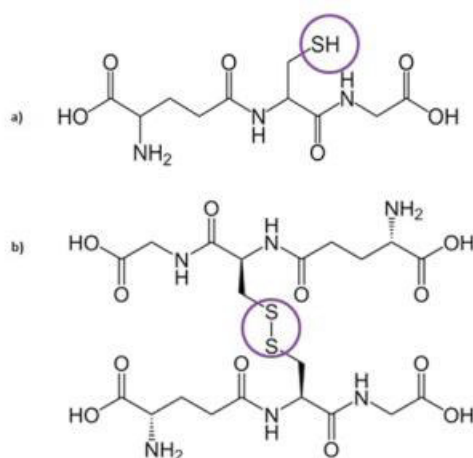


Figura 5. Estructura química de las formas de glutatión. a) Glutatión reducido (GSH), su grupo activo es el grupo SH del residuo de Cisteína (círculo). b) Glutatión oxidado, formado por dos moléculas de GSH unidas por un enlace disulfuro (círculo). Fuente. Datos tomados de Denzoin Vulcano, Soraci, & Tapia (2013)

3 CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación:

Cuantitativo Experimental.

3.2 Materiales y métodos :

3.2.1 Reactivos:

Los reactivos difenilpicril hidrazilo (DPPH), ácido ascórbico, ácido 2,2- azinobis-3-etil benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), persulfato de potasio, ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), ácido gálico, quercetina, reactivo Folin Ciocalteu, sulfato ferroso, glutatión, ácido

tiobarbitúrico (TBA), albumina bovina, L-Glutatión reducido (GSH), 2,4 dinitroclorobenzeno (CDNB), ácido etilendiaminotetraacético, (EDTA), ácido 5,5'-ditiobis -2-nitrobenzoico (DTNB), ácido tricloroacético (ATC) y pirogalol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los reactivos carbonato de sodio, cloruro de aluminio, acetato de sodio, ácido acético, etanol, fosfato monosódico, fosfato disódico, tris HCl, trizma base, ácido clorhídrico y peróxido de hidrógeno fueron comprados a la casa Merck.

3.2.2 Equipos:

Centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC2-B, espectrofotómetro Genesys 10S Vis Thermo Scientific, estufa Kerlab, centrífuga Greetmed, centrífuga PowerSpin BX, balanza analítica Sartorius, refractómetro ATAGO, molino eléctrico comercial y baño maría Tomos CDK-S22.

3.2.3 Recolección de muestra:

Se adquirió 500 gramos de la planta entera de *Gentianella nitida* en el mercado “27 de Octubre” San Juan de Lurigancho en el mes de Junio del 2012, de acuerdo a la información oral su origen de la planta fue del distrito de Ulcumayo, provincia Junín, departamento de Junín. La muestra fue identificada y depositada en el Museo de Historia

Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con el código de herbario: USM 283720 (anexo 4).

3.2.3.1 Secado y molienda:

La planta entera fue lavada con agua de grifería y con agua destilada, secada en estufa a 37°C hasta peso constante y posteriormente molida.

3.2.3.2 Preparación del extracto acuoso de Hercampuri

Se pesó 20 g de planta seca y se preparó un extracto al 4% p/v en agua bidestilada, mediante cocción durante 15 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente, se filtró en gasa. El extracto obtenido se centrifugó a 10 000 g por 15 minutos a 4°C (Sorvall modelo RC2-B®), el sobrenadante fue filtrado en papel Whatman N° 1 y luego llevado a estufa a la temperatura de 37°C hasta sequedad. Se obtuvo 5,4 g de extracto seco (sólidos solubles) y se resuspendió en 60 mL de agua bidestilada, finalmente se distribuyó en tubos cónicos de 8 ml y se guardó a -20°C, este extracto preparado constituyó la muestra para todos los análisis fisicoquímicos y bioquímicos (anexo 5).

3.2.4 Caracterización fisicoquímica

Se determinó los siguientes parámetros fisicoquímicos de:

3.2.4.1 Densidad aparente:

Está referida al peso de 1 mL del extracto preparado, para ello se midió un mililitro y se pesó en una balanza analítica (Sartorius® 220 g, d= 0,1 mg). La determinación se hizo por triplicado.

3.2.4.2 Masa seca o materia seca (ms):

Se determinó por diferencia del peso del recipiente con un 1 mL de extracto (llevado a sequedad en una estufa a 37°C hasta peso constante) y el peso del recipiente vacío. Se usó una balanza analítica (Sartorius® 220 g, d= 0,1mg). La determinación se hizo por triplicado.

3.2.4.3 Sólidos solubles (ss):

Se determinó por triplicado mediante refractometría. Se usó 300 µL del extracto y se llevó a lectura en un refractómetro (ATAGO ®), rango de medida: Brix 0.0 – 85.0 %. 1 °Brix corresponde a 1 gramo de azúcar en 100 gramos de solución.

3.2.5 Evaluación de la capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante in vitro del extracto acuoso de la planta entera mediante las siguientes pruebas:

3.2.5.1 Método de DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo):

La técnica que se utilizó fue según Brand Williams, Cuvelier, & Berset (1995) se basa en decoloración del radical DPPH[•] por la presencia de antioxidantes. El radical DPPH[•] es un compuesto sólido de color púrpura y presenta un electrón desapareado, cuando este radical libre se estabiliza frente a un antioxidante se decolora hasta quedar de color amarillo pálido. La disminución de la absorbancia a 517 nm es directamente proporcional a la capacidad antioxidante.

Se preparó la solución stock de DPPH a 36mg% y se diluyó hasta una absorbancia de $0,6 \pm 0,02$.

Se realizó diluciones del extracto acuoso de *Gentianella nitida* hasta obtener concentraciones de 0,045 a 0,225 mg/mL. Se empleó como estándar el ácido ascórbico, la curva se preparó con concentraciones de 2,4 a 10,4 µg/mL. (anexo 6)

Luego con las diluciones del extracto acuoso y las concentraciones del estándar preparadas se procedió a realizar el protocolo de trabajo.

TUBOS	TUBO BLANCO (μL)	ÁCIDO ASCÓRBICO (μL)	EXTRACTO (μL)
SOLVENTE DE EXTRACTO	400	-	-
ÁCIDO ASCÓRBICO	-	400	-
EXTRACTO	-	-	400
DPPH	800	800	800

Se mezcló y se dejó reposar por 30 minutos en oscuridad y luego se realizó la lectura a 517 nm en el espectrofotómetro.

Los resultados se expresaron en Capacidad Antioxidante Equivalente al ácido ascórbico (AAEAC-DPPH). También se calculó el IC₅₀ (μg de sólido soluble/mL). Este valor corresponde a la concentración del extracto que reduce en un 50% la absorbancia de una solución metanólica de DPPH de lectura inicial $0,6 \pm 0,02$.

3.2.5.2 Método de ABTS (ácido 2,2- azinobis-3-etil benzotiazolina-6-sulfónico):

Según la técnica de Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, & Rice – Evans (1999) se fundamenta en la decoloración del radical catión ABTS^{•+} (2,2- azinobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato). Para la formación del radical ABTS^{•+} se preparó una

solución etanólica stock de ABTS 7 mM se añadió persulfato de potasio para una concentración final de 2.45 mM. Se dejó reaccionar durante 12 – 16 horas en oscuridad a temperatura ambiente. En presencia de un agente antioxidante se produce una decoloración del compuesto y por tanto la disminución de la absorbancia.

Se usó como estándar el Trolox preparándose una curva con concentraciones de 50 a 200 µg/mL. (anexo 7)

Se preparó diluciones del extracto acuoso de *Gentianella nitida* hasta obtener concentraciones de 0,5 a 2,3 mg/mL.

Luego con las diluciones del extracto acuoso y las concentraciones del estándar preparadas se procedió a realizar el siguiente protocolo de trabajo.

TUBO	TUBO BLANCO (µL)	TROLOX (µL)	EXTRACTO (µL)
SOLVENTE DE EXTRACTO	20	-	-
TROLOX	-	20	-
EXTRACTO	-	-	20
ABTS	980	980	980

Se mezcló y se dejó reposar por 7 minutos en oscuridad y luego se realizó la lectura a 734 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición de la formación de radicales ABTS y en Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC-ABTS).

3.2.5.3 Método FRAP (Poder antioxidante de la reducción del ion férrico):

Según Benzie & Strain (1996) se fundamenta en que la forma férrica del complejo hierro-tripiridiltriazina (FeIII-TPTZ) se reduce a su forma ferrosa (FeII-TPTZ) en presencia de antioxidantes.

Preparación de la solución de trabajo FRAP:

Reactivo A: Buffer acetato 300 mM pH3.6

Reactivo B: 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM preparado en solución del HCl 40 mM

Reactivo C: Solución FeCl₃ 20 mM

Se preparó en la proporción 100:1:1 (Reactivo A: Reactivo B: Reactivo C), la mezcla se preparó en el momento.

Se preparó diluciones del extracto acuoso de *Gentianella nitida* hasta obtener concentraciones de 0,18 a 0,90 mg/mL.

Se preparó una curva de FeSO₄ a concentraciones de 100 a 750 µM, se usó como antioxidante el ácido ascórbico a concentraciones de 100 a 300 µM. (anexo 8)

Luego con las diluciones del extracto acuoso y las concentraciones del estándar preparadas se procedió a realizar el protocolo de trabajo siguiente.

TUBOS	TUBO BLANCO (μL)	FeSO_4 (μL)	ÁCIDO ASCÓRBICO (μL)	EXTRACTO (μL)
SOLUCIÓN FRAP	950	950	950	950
FeSO_4	-	50	-	-
ÁCIDO ASCÓRBICO	-	-	50	-
EXTRACTO	-	-	-	50
AGUA BIDESTILADA	50	-	-	-

Se mezcló y se dejó reposar por 10 minutos y luego se realizó la lectura a 593 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados se expresaron en μmol equivalente FeSO_4 por g sólido soluble y μmol equivalente AA por g sólido soluble.

3.2.6 Determinación de metabolitos fenólicos

3.2.6.1 Fenoles Totales:

Se cuantificó por el método de Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós (1999) usando el reactivo Folin Ciocalteau, se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes.

Fundamento: el carácter reductor (antioxidante) de los polifenoles permite la donación secuencial de electrones a la mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que al reducirse forma óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}).

Se preparó diluciones del extracto acuoso de *Gentianella nitida* hasta obtener concentraciones de 0,18 a 1,2 mg/mL.

Se usó el ácido gálico como estándar para preparar una curva patrón con concentraciones de 10 a 75 μ g/mL. (anexo 9)

Luego con las diluciones del extracto acuoso y las concentraciones del estándar preparadas se procedió a realizar el siguiente protocolo de trabajo.

TUBO	TUBO BLANCO (μL)	ÁCIDO GÁLICO (μL)	EXTRACTO (μL)
ÁCIDO GÁLICO	-	100	-
EXTRACTO	-	-	100
AGUA BIDEESTILADA	100	-	-
FOLIN – CIOCALTEU	150	150	150
MEZCLAR BIEN Y LUEGO DE 5 MINUTOS			
Na ₂ CO ₃	150	150	150
AGUA BIDEESTILADA	600	600	600

Mezclar y dejar en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos, se realizaron las lecturas a 760 nm.

La concentración de fenoles totales del extracto se expresa en μg de equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de sólido soluble.

3.2.6.2 Flavonoides:

El contenido de flavonoides se realizó a través de un ensayo colorimétrico propuesto por Geissman (1956).

Fundamento: Debido a su estructura, los flavonoides tienen la propiedad de quelar iones metálicos como el Al^{+3} y formar compuestos complejos que tienen absorbancia en la región visible.

Se preparó diluciones del extracto acuoso de *Gentianella nitida* hasta obtener concentraciones de 1,2 a 6,0 mg/mL. Se usó como estándar la quercetina y se preparó una curva con concentraciones de 10 a 100 μ g/mL. (anexo 10)

Luego con las diluciones del extracto acuoso y las concentraciones del estándar preparadas se procedió a realizar el protocolo de trabajo siguiente.

TUBOS	TUBO BLANCO (μ L)	QUERCETINA (μ L)	EXTRACTO (μ L)
QUERCETINA	-	100	-
EXTRACTO	-	-	100
$AlCl_3$	100	100	100
ETANOL	900	800	800

Mezclar y dejar en reposos por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se realizó las lecturas a 432 nm.

La concentración de flavonoides totales del extracto se expresa en μ g de equivalente de quercetina (EQ) por mg de sólido soluble.

3.2.7 Ensayos bioquímicos in vivo

3.2.7.1 Modelo experimental para el estudio del efecto hepatoprotector del *hercampuri*:

Se trabajó con 24 ratas albinas Holtzman hembras de 2 meses obtenidas del Instituto Nacional de Salud, de peso 180 - 200 gramos, colocadas en jaulas individuales en condiciones controladas ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas), alimentadas con alimentos para ratas de la Universidad Nacional Agraria la Molina y agua ad libitum, con un período de adaptación de una semana, seleccionadas aleatoriamente para formar los grupos experimentales.

Diseño experimental: Se formaron 4 grupos experimentales ($n= 6$). El grupo experimental paracetamol fue sometido a una dosis 300mg/kg de peso de paracetamol durante 4 días. Se usó la vía orogástrica para las ratas de los cuatro grupos.

3.2.7.2 Grupos:

Grupo Control: se le administró 1,0 mL de agua destilada por 11 días.

Grupo paracetamol: se le administró 1,0 mL de agua destilada por 7 días y luego continuó con la administración durante 4 días de paracetamol a una dosis de 300 mg/kg de peso corporal.

Grupo silimarina: se le administró una dosis de SILIMARINA de 50 mg/kg de peso corporal durante 7 días y luego se continuó con la administración de paracetamol a una dosis de 300 mg/kg de peso corporal por 4 días.

Grupo *Gentianella nitida*: recibieron extracto acuoso de Hercampuri de 200 mg/kg de peso corporal por 7 días, y luego se continuó con la administración de paracetamol a una dosis de 300 mg/kg de peso corporal por 4 días.

Terminado el tratamiento experimental, las ratas en un estado de ayuno de 8 horas fueron anestesiadas usando éter etílico, y luego sacrificadas siguiendo las normas éticas para el uso de animales de laboratorio.

3.2.7.3 Aspectos éticos

En el presente estudio para el uso de los animales de experimentación ratas hembras albinas Holtzman, se tuvo en consideración el título IV: de la Experimentación e Investigación y la Docencia, de la Ley N° 11794-2000, Ley Peruana de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio.

3.2.7.4 Procesamiento para la obtención de muestra biológica:

Todo el procedimiento se realizó a una temperatura 4°C. Se sacrificó a las ratas hembras albinas con éter, se realizó una perfusión in vivo con NaCl al 0,9%, luego se extrajo el hígado y se depositó en un vaso que contenía NaCl al 0,9% en baño de hielo. Se pesó 1,5 g de tejido hepático, se cortó finamente con unas tijeras y se homogenizó en un homogenizador de vidrio tipo Potter- Elvehjem con émbolo de teflón. Se preparó un

homogenizado al 10% en buffer fosfato de sodio 50 mmol/L pH 7,4. Se centrifugó a 12 000 g por 15 minutos a 4°C (Sorvall modelo RC2-B®) se eliminó el precipitado y se trabajó con el sobrenadante postmitocondrial.

3.2.7.5 Parámetros bioquímicos del estudio experimental:

3.2.7.5.1 Determinación de Catalasa:

El ensayo consiste en la descomposición del H₂O₂ hasta agua, observándose decrecimiento en la absorbancia a 240 nm. La reacción se realizó en buffer fosfato 50 mM a pH 7,0 y se midió durante 3 minutos. La diferencia de absorbancia por unidad de tiempo es la medida de la actividad de catalasa. (Aebi, 1984)

Una unidad de catalasa (U) equivale a la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de un micromol de peróxido de hidrógeno por minuto, bajo las condiciones de ensayo. Se usó el coeficiente de extinción (ϵ_{240}) = 39,4 M⁻¹. cm⁻¹.

Muestra: para la medición de la actividad, se realizó una dilución 1/1000 del homogenizado de hígado al 10%.

El peróxido de hidrógeno preparado en el mismo buffer de dilución tuvo una concentración de 30 mM y se preparó antes de realizar la prueba para evitar su descomposición.

En la cubeta de 1 mL se agregó la muestra diluida en buffer y se puso a baño maría a 30°C, luego se colocó en el espectrofotómetro y se agregó el peróxido de hidrógeno en una relación 2:1 (muestra/peróxido) inmediatamente se procedió a realizar la lectura a 240 nm en el espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis. Según la siguiente fórmula:

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{\Delta \text{Absorbancia}/\text{min} \times \text{volumen total (mL)} \times \text{factor de dilución}}{\epsilon (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}) \times \text{longitud de la cubeta (cm)} \times \text{volumen de muestra (mL)}}$$

Los resultados fueron expresados en U/mg de proteína.

3.2.7.5.2 Determinación de Superóxido dismutasa:

Este método se mide la actividad de la superóxido dismutasa mediante la inhibición de la autooxidación del pirogalol a pH alcalino con formación del radical superóxido, proceso que se mide a 420 nm. Esta reacción sigue una cinética lineal y es inhibida por SOD. (Marklund & Marklund, 1974)

Muestra: para la medición de la actividad, se realizó una dilución 1/5 del homogenizado de hígado al 10%.

En la cubeta de 1 mL se colocó 950 μL de buffer tris HCl 0,05 M, a pH 8,2, se añadió 50 μL pirogalol 2 mM, produciéndose un cambio de absorbancia de 0,02 +/- 10% por minuto, leído en el espectrofotómetro a una longitud de onda 420 nm. Para la lectura de las muestras, se colocó una cantidad de homogenizado al 10% que disminuyera el cambio de absorbancia a la mitad. Una unidad SOD es igual al 50% del cambio de absorbancia del pirogalol por minuto. Según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad SOD} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 50\% \times \frac{\text{volumen total (mL)}}{\text{volumen de muestra (mL)}} \times \text{factor de dilución}$$

Los resultados se expresaron en U/mg de proteína.

3.2.7.5.3 *Determinación de Glutación S-transferasa:*

La actividad de la enzima se determina espectrofotométricamente a 340 nm mediante la medición de la formación del conjugado de glutación (GSH) y 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB). Se usó el coeficiente de extinción (ϵ_{340}) = 9,6 mM⁻¹. cm⁻¹. (Habig & Jakoby, 1981)

Muestra: para la medición de la actividad, se realizó una dilución 1/100 del homogenizado de hígado al 10%.

En la cubeta de 1 mL se colocó 680 µL de buffer fosfato de sodio 0,1M, pH 6,5, se añadió 40 µL GSH 20mM y 40 µL CDNB incubar 1 minuto a 30°C; luego se añadió 40 µL de muestra y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda 340 nm por 4 minutos. Según la siguiente fórmula:

$$U = \frac{\Delta \text{Absorbancia/min} \times \text{volumen total (mL)} \times \text{factor de dilución}}{\text{c.e.m (mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}) \times \text{longitud (cm)} \times \text{volumen de muestra (mL)}}$$

Los resultados se expresaron en U/mg de proteína.

3.2.7.5.4 *Determinación de Glutación reducido:*

Con ligeras modificaciones, se midió los niveles de glutación mediante el método químico con DTNB (ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)) que reacciona específicamente con los grupos sulfhidrilo. (Boyne & Ellman, 1972)

Muestra pre tratada: Se midió 950 μL de homogenizado y se le añadió 50 μL de ácido tricloroacético (ATC) al 100%; se agitó y se llevó a centrifugación por 8 minutos a 15 000 g.

Luego se colocó 200 μL de sobrenadante en un tubo de ensayo, se incubó a 67°C por cinco minutos, al enfriar se agregó 200 μL de DTNB. Se leyó a 412 nm. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína. Según la siguiente fórmula:

$$[\text{Glutación } (\mu\text{mol}/\text{mL})] = \frac{\overline{\text{Fc}} \times \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Volumen real de la muestra}}$$

$\overline{\text{Fc}}$ = el promedio del factor de calibración del estándar.

$$\text{Fc} = \frac{[\text{estándar } (\mu\text{mol})]}{\text{Absorbancia del estándar}}$$

3.2.7.5.5 Determinación de Lipoperoxidación: (TBARs)

La determinación se basa en medir el contenido de malondialdehído (MDA) que al reaccionar con el TBA (ácido tiobarbitúrico) forma un complejo coloreado que se lee a 535 nm. La concentración de MDA, es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto es un buen indicador de peroxidación lipídica, el color de la reacción es rosada. El coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. (Buege & Aust, 1978)

Luego de prepararse el homogenizado 10% se procedió a realizar el protocolo de trabajo.

TUBOS	TUBO BLANCO (mL)	HOMOGENIZADO 10% (mL)
AGUA DESTILADA	0,3	-
HOMOGENIZADO 10%	-	0,3
TCA 20%	0,6	0,6
BAÑO MARÍA 10 MINUTOS A 100°C		
ENFRIAR CON AGUA HELADA		
TBA 0,67% en HCL 0,25N	0,9	0,9
BAÑO MARÍA 30 MINUTOS A 100°C		
ENFRIAR CON AGUA HELADA		

Luego se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos, se separó el sobrenadante y se llevó a lectura a 535 nm. Según la siguiente fórmula:

$$[\text{Lipoperoxidación } (\mu\text{mol})] = \frac{\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Absorbancia del blanco}}{\text{c.e.m}(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times \text{longitud de la cubeta (cm)} \times \text{vol. de la muestra} \times \text{factor de dilución}}$$

Los resultados se expresaron $\mu\text{mol TBARs/mg}$ de proteína.

3.2.7.5.6 Determinación de Proteínas totales:

Se basa en la reacción de los iones de cobre con los enlaces peptídicos en medio alcalino formándose enlaces de coordinación, en este complejo formado, los grupos OH reducen el reactivo de Folin dando un color azul. (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951)

Se usó como estándar la albúmina bovina preparándose una curva con concentraciones de 0,05 a 1,2 mg/mL.

Para la medición de las proteínas totales, se realizó una dilución 1/20 del homogenizado de hígado al 10%, luego se procedió a realizar el siguiente protocolo de trabajo.

TUBOS	TUBO BLANCO (μL)	ALBUMINA (μL)	HOMOGENIZADO 10% (μL)
AGUA DESTILADA	40	-	-
ALBUMINA		40	-
MUESTRA DILUIDA	-	-	40
TAMPÓN ALCALINO	400	400	400
REACTIVO CÚPRICO	160	160	160
Mezclar y dejar en reposo 5 minutos			
REACTIVO FOLIN CIOCALTEU	300	300	300

Se deja en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lleva a leer al espectrofotómetro a 700 nm.

$$[\text{Proteínas totales (mg/mL)}] = \frac{\text{Estándar de P.T}}{\text{Absorbancia del Estándar}} \times \text{Absorbancia de la muestra} \times \text{factor de dilución}$$

Los resultados se expresaron en mg/mL.

3.3 Análisis estadísticos

Los resultados de la evaluación del extracto se presentan como promedio, desviación estándar de 3 determinaciones independientes. Los resultados del diseño experimental no presentó una distribución normal, se aplicó prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, y como prueba pos hoc Mann Whitney. La significancia estadística será considerada con el $p < 0,05$. Se utilizó el programa estadístico STATA12.

4 CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Del extracto de *Gentianella nitida*

4.1.1.1 Caracterización fisicoquímica

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de *Gentianella nitida* puede observarse que la densidad aparente es ligeramente superior a la densidad del agua (tabla 2).

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de *Gentianella nitida*.

	X ± DS
Densidad aparente (g/mL)	1,032 ± 0,017
Materia seca (mg/mL) - Gravimetría	76,6 ± 1,55 ^a
Sólido soluble (mg/mL) - Refractometría	81,6 ± 0,06 ^a

a: $p = 0,005$

4.1.1.2 Evaluación de la capacidad antioxidante

En la evaluación de la capacidad antioxidante, el IC₅₀, mediante la técnica de DPPH tuvo un valor de $145 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$ (figura 6) y mediante la técnica de ABTS $1,49 \pm 0,05 \text{ mg/mL}$ (figura 7), observándose una mejor capacidad antioxidante con el método que se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil frente al radical catiónico de ABTS^{•+}. Las sustancias estándares ácido ascórbico en la prueba con DPPH, tuvo un IC₅₀ de $8,88 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ y del Trolox en la prueba con ABTS^{•+} el IC₅₀ fue de $149,1 \pm 6,8 \mu\text{g/mL}$.

Otra prueba realizada es el poder antioxidante de la reducción del ión férrico (FRAP) a diferentes concentraciones de extracto. (figura 8).

Con respecto al contenido de los metabolitos secundarios fenólicos (tabla 3) se observó que el contenido de flavonoides corresponde al 18% de fenoles totales cuando es expresado en unidades de masa y al 10% cuando es expresado en unidades químicas.

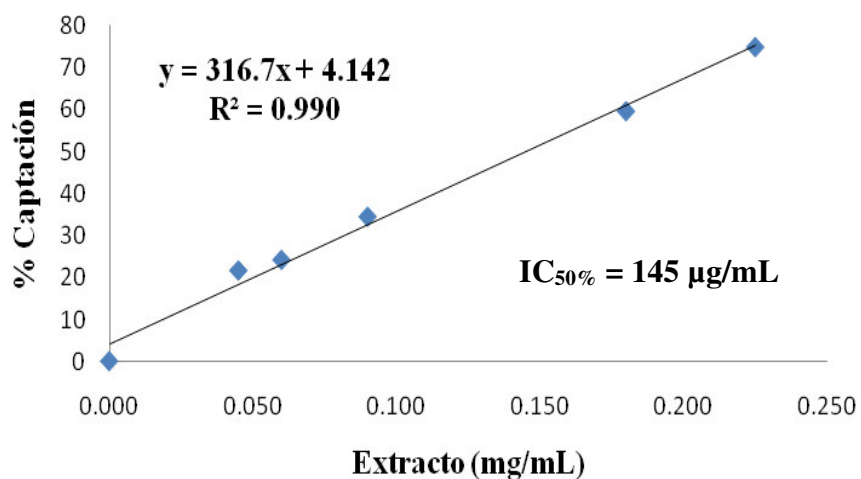


Figura 6. El extracto de *Gentianella nitida* frente al radical libre estable de DPPH para determinar el IC_{50} . (517nm)

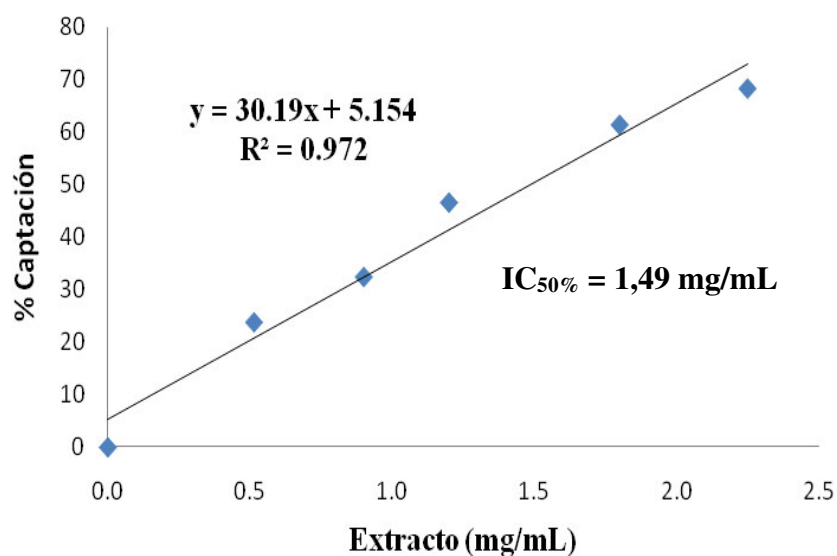


Figura 7. *Gentianella nitida* frente al radical libre ABTS para determinar el IC_{50} . (734nm)

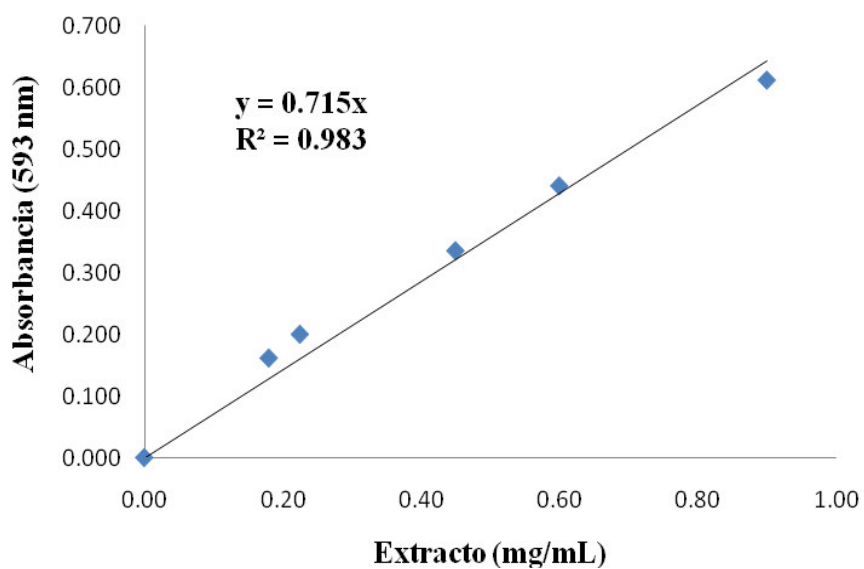


Figura 8. Capacidad reductora del hierro férrico de *Gentianella nitida*.

Tabla 3. Capacidad antioxidante del extracto acuoso de *Gentianella nitida*.

	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL ($\mu\text{g}/\text{mg}$) X \pm DS	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) X \pm DS
DPPH	$56 \pm 6,7$ ¹	$28,6 \pm 3,4$ ¹
ABTS	$87,7 \pm 3,0$ ²	$31,5 \pm 1,1$ ²
FRAP	$98,5 \pm 6,5$ ³	$57,4 \pm 3,1$ ³
FENOLES TOTALES	$65,8 \pm 2,1$ ⁴	$34,8 \pm 1,1$ ⁴
FLAVONOIDES	$11,7 \pm 0,8$ ⁵	$3,5 \pm 0,2$ ⁵

¹**AAEAC-DPPH:** Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico; ²**TEAC-ABTS:** Capacidad antioxidante equivalente a trolox; ³**AAEAC-FRAP:** Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico; ⁴**EAG:** Equivalente a ácido gálico; ⁵**EQ:** Equivalente a quercetina.

Los resultados de coeficiente de correlación de la capacidad antioxidante con las tres técnicas aplicadas frente al contenido de metabolitos secundarios fenólicos muestran un valor de r cercano a la unidad en todos los casos (tabla 4).

Tabla 4. Coeficiente de Correlación de Pearson (r) del extracto acuoso de *Gentianella nitida*.

	FENOLES TOTALES	FLAVONOIDES
DPPH	0,974	0,953
ABTS	0,984	0,963
FRAP	1,000	0,994

X= técnicas antioxidantes (DPPH, ABTS, FRAP); Y= fenoles totales o flavonoides

4.1.2 Parámetros bioquímicos del estudio experimental

El organismo vivo dispone de una serie de sistemas antioxidantes para mantenerse en equilibrio frente a los radicales libres. Y en el presente trabajo se determinó algunas de las enzimas antioxidantes intracelulares como: catalasa, superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa, y otros antioxidantes no enzimáticos como el glutatión.

4.1.2.1 Determinación de la actividad específica de la Catalasa

En los resultados de la figura 9 se observa una tendencia al aumento de la actividad específica de la catalasa en el grupo paracetamol, sin embargo estadísticamente no es significativa. .

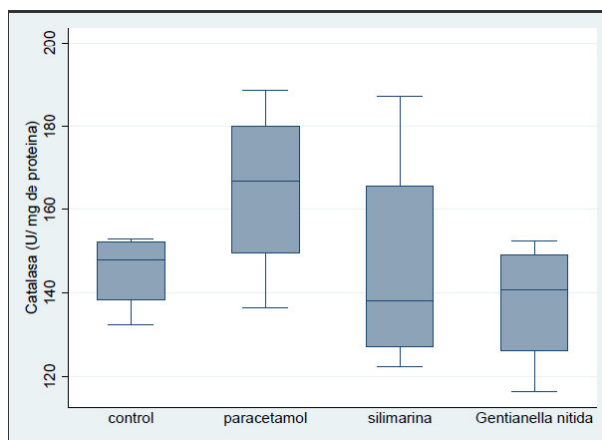


Figura 9. El Efecto de *Gentianella nitida* en la actividad de la catalasa en homogenizado de hígado. ($p= 0.3086$)

4.1.2.2 Determinación de la actividad específica de la Superóxido dismutasa

El análisis estadístico de los resultados que se muestran en la figura 10, corresponde a la actividad específica de la SOD y tiene diferencia significativa. En el análisis por pares, la diferencia se establece por la actividad disminuida en el grupo paracetamol.

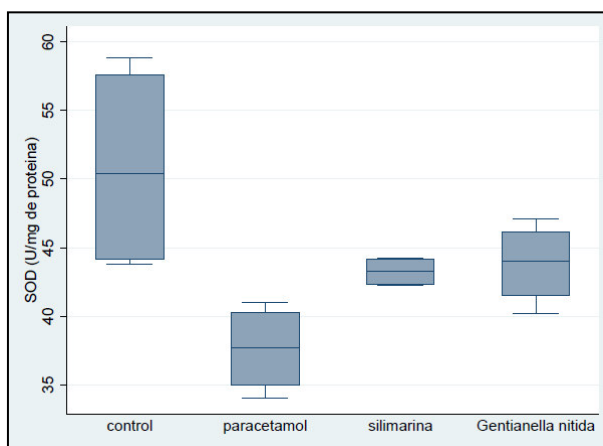


Figura 10. El Efecto de *Gentianella nitida* en la actividad de la superóxido dismutasa en homogenizado de hígado. ($p=0.0215$)

Los resultados de las actividades específicas de las enzimas que tiene a las ROS como sustratos, SOD y catalasa en los grupos experimentales muestran que el extracto de *Gentianella nitida* conserva un balance SOD/CAT muy cercano al grupo control (tabla 5), puede observarse que se produce un menor desbalance en la inducción de hepatotoxicidad frente al paracetamol.

Tabla 5. Resultados de la actividades específicas de las enzimas Catalasa y Superóxido dismutasa.

GRUPOS	CATALASA (U/mg prot)		SOD (U SOD/mg prot)		Relación SOD/CAT	% Balance de la relación SOD/CAT
	Promedio	DS	Promedio	DS		
CONTROL	145.4	9.4	50.9	7.8	0.35	100
PARACETAMOL	164.8	21.8	37.6	3.2	0.23	58
SILIMARINA	146.4	28.7	43.3	1.0	0.30	84
<i>Gentianella nitida</i>	137.6	15.7	43.8	3.0	0.32	91

4.1.2.3 Determinación de la actividad específica de la Glutación S-transferasa

Otra enzima antioxidante importante es la glutatión transferasa cuya actividad se observa en el gráfico siguiente:

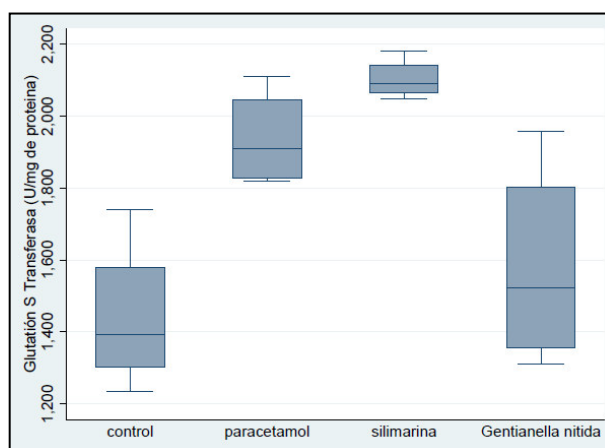


Figura 11. El Efecto de *Gentianella nitida* en la actividad de la Glutación S transferasa en homogenizado de hígado. (p=0.0122)

4.1.2.4 Determinación de los niveles de Glutación reducido

En la figura 12 podemos observar la diferencia significativa de las medianas entre los grupos en la determinación de los niveles de glutación reducido.

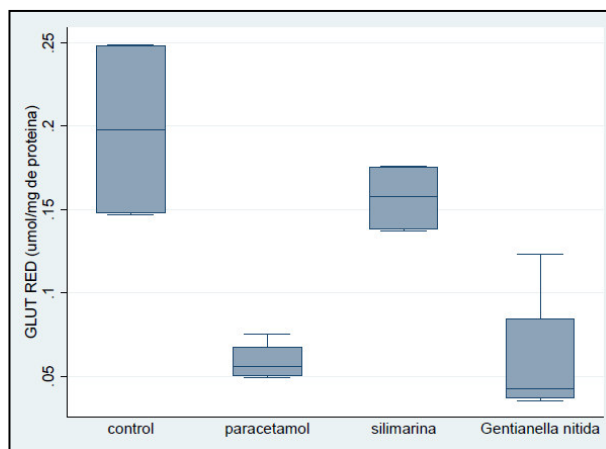


Figura 12. El Efecto de *Gentianella nitida* sobre los niveles de glutación reducida en homogenizado de hígado. (p=0.0074)

4.1.2.5 Determinación de Lipoperoxidación

Los resultados de este indicador se observa en la siguiente figura:

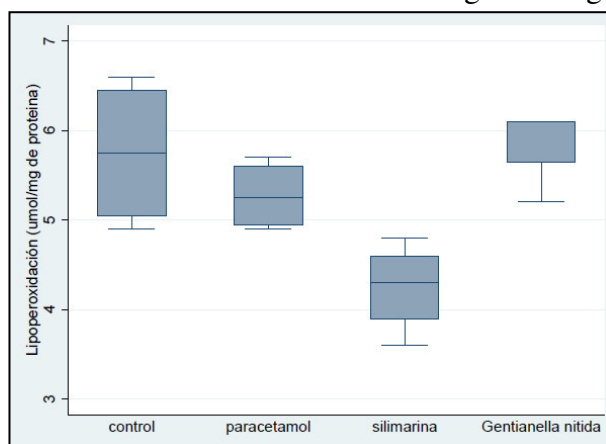


Figura 13. El Efecto de *Gentianella nitida* en la lipoperoxidación en homogenizado de hígado. (p=0.0205)

4.1.2.6 Determinación de Proteínas totales

Las medianas entre los grupos estadísticamente no son significativas en la determinación de proteínas totales, tal como se observa en la figura 14.

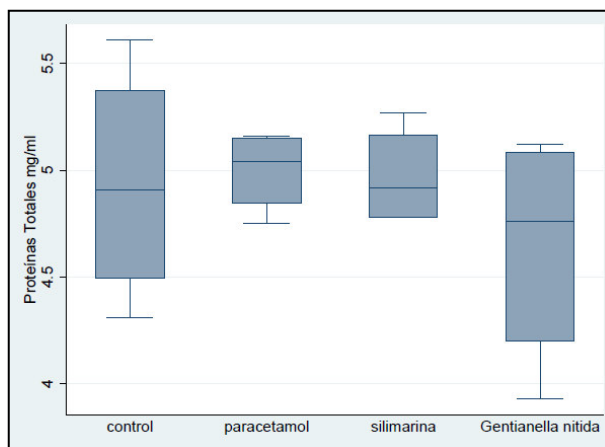


Figura 14. El Efecto de *Gentianella nitida* en las proteínas totales en homogenizado de hígado. ($p=0.6547$)

4.2 DISCUSIÓN

Los estudios en *Gentianella nitida* en nuestro país son escasos y más aún sobre las propiedades fisicoquímicas. Los resultados obtenidos sobre densidad aparente, materia seca y sólidos solubles son, de acuerdo a la literatura revisada, iniciales por lo que los datos reportados contribuyen a incrementar la información sobre esta planta.

En la tabla 2 se observa una diferencia significativa entre los valores de materia seca y sólidos solubles. Si bien estos parámetros suelen ser equivalentes cuando se trata de soluciones transparentes, en este caso el extracto tenía un aspecto homogéneo pero con ligera turbidez lo que explicaría un mayor valor cuando se determina por refractometría.

La capacidad antioxidante total del extracto acuoso de *Gentianella nitida* tiene un IC_{50} de $145 \mu\text{g/mL} \pm 2,5$, frente al radical DPPH (figura 6). Con esta misma técnica Lock et al. (2005) demostraron que el extracto etanólico de *Gentianella nitida* tiene un IC_{50} $13,70 \mu\text{g/mL}$. Como en el caso comparado con la extracción de polifenoles, el uso de un solvente orgánico puede haber facilitado una mayor extracción de metabolitos con capacidad antioxidante. Sin embargo, en el estudio de Nikolova et al. (2014) en extracto metanólico la *Gentianella bulgarica* el valor fue IC_{50} $422 \mu\text{g/mL}$. Se observa que el extracto acuoso de *Gentianella nitida* a pesar de tener un menor contenido de polifenoles (tabla 3) exhibe una mejor capacidad antioxidante comparado con el extracto metanólico de Nikolova et al. Considerando que el solvente metanólico es además tóxico puede postularse que el extracto acuoso sería un medio más adecuado de extracción y es la forma como tradicionalmente se usa.

Otros productos naturales estudiados por su capacidad antioxidante y su contenido de polifenoles son la uña de gato, el maíz morado y el yacón. Los extractos hidroalcohólicos de estos recursos también han sido enfrentados con el radical DPPH, mostrando resultados de IC_{50} para la uña de gato de $12,05 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$, para el maíz morado $28,89 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$ y para el yacón de $64,52 \pm 0,66 \mu\text{g/mL}$ según Doroteo et al. (2013), estos resultados expresan una mejor capacidad antioxidante que el extracto acuoso de *Gentianella nitida*. Este menor valor de IC_{50} podría explicarse por el medio de extracción usado, entendiéndose que la mezcla de solventes puede favorecer una mayor extracción de metabolitos secundarios con actividad antioxidante.

Según A.A. Al-Laith et al. el extracto alcohólico de la planta *Emex spinosus* tuvo de AAEAC- DPPH $0,44 \text{ mg/g}$ materia seca y fenoles totales $167,485 \text{ mg EAG/100 g}$ materia seca comparándola con la *Gentianella nitida* que tuvo AAEAC- DPPH $59,65$

mg/g materia seca y fenoles totales fue 7007,7 mg EAG/ 100 g materia seca. Con estos datos observamos que la *Gentianella nitida* tiene mayor contenido de fenoles totales por lo tanto mayor capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante total, expresado en TEAC-ABTS, del extracto acuoso de *Gentianella nitida* fue $3,15 \pm 0,11$ mmol trolox/100mL (tabla 3), comparado con el estudio de Berlowski et al. (2013) en el que reportó que la infusión del *Geranium dielsianum* tuvo un valor de TEAC-ABTS de $0,645 \pm 0,027$ mmol trolox/100mL y el de *Uncaria tomentosa* de $0,513 \pm 0,061$ mmol trolox/100mL, *Gentianella nitida* muestra una mejor capacidad antioxidante.

Al comparar los valores de IC₅₀ del extracto en estudio con el IC₅₀ de la vitamina C ($8,88 \mu\text{g/mL}$) en la técnica con DPPH y con el IC₅₀ del trolox ($149,1 \mu\text{g/mL}$) en la técnica con ABTS, se observa que las moléculas de referencia tienen una capacidad antioxidante alrededor de quince y diez veces mayor que *Gentianella nitida*, respectivamente. Es explicable el resultado teniendo en cuenta que la sustancia de referencia es un compuesto puro y la muestra ensayada es un extracto, el cual es una mezcla de metabolitos secundarios con y sin actividad antioxidante.

La literatura para evaluar capacidad antioxidante con el ensayo FRAP de extractos para el género *Gentianella* es escasa. Berlowski et al. (2013) aplicaron la técnica FRAP para estudiar la capacidad antioxidante de 10 plantas medicinales del Perú, que incluyó a la *Gentianella alborosea*. Los extractos se obtuvieron por infusión seguido de 10 horas de reposo en oscuridad, los resultados mostraron los valores más altos para *Tiquilia paronychioides* $0,607 \pm 0,022$ mmol Fe/100mL, *Geranium dielsianum* $0,562 \pm 0,017$ mmol Fe/100mL y de *Uncaria tomentosa* fue $0,507 \pm 0,016$ mmol Fe/100mL. La *Gentianella alborosea* no mostró una buena capacidad antioxidante, siendo el resultado menor a 0,1 mmol Fe/100 mL. En el presente trabajo se obtuvo un resultado de $5,74 \pm 0,31$ mmol Fe/100mL, lo que significa que *Gentianella nitida* exhibe una mejor capacidad reductora en las condiciones de extracción (figura 8).

El contenido total de los polifenoles del extracto acuoso de *Gentianella nitida* tiene 65,8 mg/g \pm 2,1 (tabla 3), estudios reportados por Nikolova et al. (2014) sobre el extracto metanólico de la *Gentianella bulgarica* muestran un valor de 110,45 mg/g \pm 7,2. Este mayor valor igualmente podría explicarse por la mezcla de solventes usado que puede favorecer una mayor extracción de metabolitos secundarios polifenólicos.

Comparando los datos reportados de capacidad antioxidante ($IC_{50} = 422 \mu\text{g/mL}$) y su contenido de polifenoles (110,45 mg/g) para la *Gentianella bulgarica*, con los datos de capacidad antioxidante ($IC_{50} = 145 \mu\text{g/mL}$) y el contenido de polifenoles (65,8 mg/g) para *Gentianella nitida*, puede proponerse que esta última tendría mayor capacidad antioxidante que la *Gentianella bulgarica*, aun cuando el contenido de polifenoles es menor; puede sugerirse que estos metabolitos oxigenados muestran buena capacidad antioxidante o tal vez el extracto puede contener otros metabolitos secundarios diferentes que contribuyen a la actividad antioxidante.

Doroteo et al. (2013) han reportado los polifenoles totales de la uña de gato ($17,3 \pm 0,01$ mg/g), del maíz morado ($33,2 \pm 3,40$ mg/g) y del yacón ($12,8 \pm 0,02$ mg/g), comparando estos resultados con el obtenido en el extracto acuoso de *Gentianella nitida* ($65,8 \pm 2,1$ mg/g), esos extractos tienen una alta capacidad antioxidante aunque tengan un menor contenido de polifenoles (tabla 3).

La capacidad antioxidante demostrada con DPPH, ABTS y FRAP puede deberse al contenido total de polifenoles, esto se desprende de los elevados valores del coeficiente de correlación de Pearson que se observa en la tabla 4. Asimismo, puede decirse que la capacidad reductora de hierro (FRAP) se debería al componente flavonoide de los polifenoles presentes en el extracto (anexo 11 - 16) que exhibe un $R=0,994$.

El extracto acuoso de *Gentianella nitida* exhibe capacidad antioxidante in vitro con las tres técnicas aplicadas, contiene metabolitos secundarios fenólicos demostrado por los fenoles totales y flavonoides. El comportamiento antioxidante guarda correlación con el contenido de compuestos fenólicos. Estos compuestos fenólicos actuarían principalmente donando un átomo de hidrógeno y/o donando un electrón.

La capacidad antioxidante mostrada en los ensayos in vitro también puede observarse en el modelo in vivo. Así, los resultados obtenidos en la parte experimental muestran que el extracto de *Gentianella nitida* modifica la actividad de algunas enzimas del sistema de defensa antioxidante.

El modelo de hepatotoxicidad con acetaminofén pone en evidencia que las enzimas antioxidantes relacionadas con ROS son modificadas, “la catalasa y la superóxido dismutasa constituyen la defensa antioxidante principal de las células aerobias” según Fridovich (1969) y se debería observar aumento de su actividad como respuesta frente a las especies reactivas de oxígeno. En el presente estudio, la actividad de la catalasa no mostró un aumento significativo en el grupo paracetamol, sin embargo puede observarse una tendencia notoria hacia el incremento (figura 9).

En el estudio de You et al.(2010) si se observó una disminución significativa de la actividad de la catalasa en el modelo de injuria hepática en ratón inducida con etanol a una dosis de 5g/kg peso corporal por día durante 8 días. La administración de *Taraxacum officinale* después del daño consiguió la recuperación de la actividad comparable con el grupo control.

La diferencia en los resultados en ambos estudios podría explicarse por diversos motivos, como el agente injuriante, la naturaleza química del xenobiótico, la dosis empleada y el tiempo de experimentación. Por la naturaleza química, el etanol es una molécula más sencilla y de fácil biodisponibilidad en comparación del acetaminofén. La dosis empleada del paracetamol fue un poco alejada de la dosis tóxica que incluye también el corto tiempo de tratamiento de 4 días. Adicionalmente es importante mencionar que la catalasa tiene un elevado K_m para el peróxido de hidrógeno (8 – 25 mM), razón por la que es difícil esperar una marcada disminución debido a su gran capacidad de reducir a esta ROS.

La actividad de la SOD exhibió diferencia significativa ($p < 0,05$) observándose disminuida en el grupo paracetamol (figura 10), esta enzima puede ser inactivada por concentraciones elevadas de peróxido de hidrógeno (Pigeolet, y otros, 1990). Se observó

recuperación de la actividad de la enzima en los grupos silimarina y *Gentianella nitida* equiparable a la actividad de la enzima al grupo control. En el estudio de Abirami et al. (2015) igualmente se observó una disminución de la actividad de la SOD en el modelo de daño hepático con paracetamol en ratas inducida a una dosis de 2g/kg peso corporal por día, durante 7 días. La administración de hojas *Citrus hystrix* después del daño consiguió la recuperación de la actividad comparable con el grupo control.

Luego la administración del extracto de *Gentianella* inició la recuperación de la actividad de SOD en el modelo ensayado. Esta recuperación también puede analizarse al tomar los datos de la relación SOD/CAT (tabla 5), mostrando que el grupo *Gentianella nitida* es la que ha mantenido una relación equivalente al 91% tomando como referencia el balance del grupo control.

En la determinación de la actividad glutatión-S-transferasa se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$); el grupo paracetamol y silimarina se observó aumentada la actividad de la enzima con respecto al grupo control y grupo *Gentianella nitida* (figura 11). No hay diferencia entre grupo control y *Gentianella nitida*, igualmente entre el grupo de acetaminofén y el grupo silimarina. Se desconoce a que nivel esta protegiendo *Gentianella nitida* para que la enzima asemeje su actividad al del control. En el grupo silimarina sin embargo se observó modificada la actividad de la enzima elevada como el grupo con acetaminofén, esta elevación de la enzima se debería a que tuvo que conjugarse con el compuesto tóxico NAPQ1 para su eliminación. En el estudio de You et al. (2010) si se observó una disminución significativa de la actividad de la glutatión-S-transferasa del grupo con etanol a una dosis de 5g/kg peso corporal por día, durante 8 días en ratones, y el grupo al que se le administró *Taraxacum officinale* después del daño hepático, la enzima recuperó la actividad semejándose al grupo control. A ambos estudios se diferencian en la actividad de la enzima porque el modelo de daño hepático es diferente, por lo tanto la detoxificación también.

En la determinación del glutatión reducido se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$), en el análisis por pares se observó niveles disminuidos del tripéptido en el grupo

paracetamol y en el grupo *Gentianella nitida* (figura 12), en comparación con el grupo control y el grupo silimarina. La disminución de los niveles de glutatión podría explicarse si la actividad de la glutatión peroxidasa estuviera catalizando inicialmente la reducción del peróxido de hidrógeno donde el GSH es el cosustrato de esta enzima. De acuerdo al resultado obtenido en la actividad de catalasa, donde no se observó diferencias significativas, puede proponerse entonces que la reducción del peróxido de hidrógeno vía glutatión peroxidasa sería la ruta principal o inicial de la detoxificación. Lo mismo se observó en el estudio de Hassan et al. (2010) una disminución significativa de la concentración del glutatión reducido en el modelo de daño hepático con nitrosamina (0,05%) en el agua de beber y a la vez clorpromazina a una dosis de 1,7 mg/kg de peso por día durante 8 días por tubo gástrico en ratas machos; la administración de *Cichorium intybus* L. después del daño hepático consiguió la recuperación de la concentración del glutatión reducido.

Otro indicador del estrés oxidativo es el estudio de TBARS que es principalmente a nivel de membranas celulares, la lipoperoxidación llevada a cabo por especies reactivas de oxígeno causan daño celular y destrucción de membranas. En la determinación de la lipoperoxidación se encuentra diferencia significativa ($p < 0,05$), la significancia se encuentra entre el grupo silimarina y los otros tres grupos (figura 13). Los resultados casi homogéneos en los grupos control, grupo paracetamol y grupo *Gentianella nitida* (figura 4) se podría explicar por la concentración de la dosis o tal vez el daño está a otro nivel del proceso de peroxidación lipídica (formación de más dienos conjugados). Los datos en el estudio de Zakaria Hamza, R y Salem Al-Harbi, M (2015) se observó un aumento significativo de la lipoperoxidación en el modelo de daño hepático en ratones machos inducido con acetaminofén a una dosis de 2g/kg de peso corporal por día durante 30 días. En el grupo administrado con silimarina y *Nigella sativa* se observa una disminución en la lipoperoxidación semejándose al grupo control, entonces hubo protección frente a los radicales libres. Hay factores que explican la diferencia en los resultados en ambos estudios como la dosis utilizada y el tiempo de experimentación.

Se observó que las proteínas totales no tiene diferencia significativa: el grupo control, grupo paracetamol, el grupo silimarina y el grupo *Gentianella nitida* todos tuvieron la misma concentración (figura 14).

Todos los indicadores evaluados *in vitro* e *in vivo* conllevan a demostrar que la planta *Gentianella nitida* tiene propiedades antioxidantes que validarían el uso tradicional de los pobladores para problemas hepáticos.

CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de *Gentianella nitida* exhibe buena capacidad antioxidante *in vitro* con las tres técnicas aplicadas: DPPH, ABTS y FRAP, y contiene metabolitos secundarios polifenólicos que guardan correlación con la capacidad antioxidante *in vitro*.
- El extracto acuoso de *Gentianella nitida* evita la disminución de las actividades de enzimas antioxidantes hepáticas frente a un daño de los ROS producidos por el paracetamol especialmente en la actividad de la SOD y en la relación SOD/CAT. El extracto acuoso de *Gentianella nitida* ejerce efecto hepatoprotector a nivel de la detoxificación II del paracetamol expresado en la actividad de la glutatión S-transferasa.
- El extracto acuoso de *Gentianella nitida* no influyó sobre la lipoperoxidación, sin embargo hay agotamiento en el glutatión reducido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abirami, A., Nagarani, G., & Siddhuraju, P. (2015). Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. *Food science and human wellness* , 4, 35-41.
2. Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology* , 105, 121 - 126.
3. Agapito, T., & Sung, I. (1998). *Fitomedicina: 1100 Plantas Medicinales*. Lima: Ed. Isabel.
4. Al-Laith, A. A., Alkhuzai, J., & Freije, A. (2015). Assessment of antioxidant activities of three wild medicinal plants from Bahrain. *Arabian Journal of Chemistry* , 2-4.
5. Arnao Salas, A. I., Suárez Cunza, S., Trabuco Ricaldi, J., Cisneros Chinchay, R., & Rodrigo Rojas, M. E. (2012). Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) en un modelo de intoxicación con acetaminofén. *Anales de la Facultad de Medicina* , 73 (3), 239-244.

6. Bafna, A., & Mishra, S. (2004). Efecto del extracto de metanol de *Achyranthes aspera* linn. sobre la hepatotoxicidad inducida por rifampicina en ratas. *Ars Pharmaceutica* , 45 (4), 343-351.
7. Benavides Rivera, E. (1998). Alteraciones en el metabolismo de los lípidos por acción de *Gentianella alborosea*. *Tesis* , 14-17. Lima, Perú.
8. Benzie, I., & Strain, j. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* , 239, 70 - 76.
9. Berlowski, A., Zawada, K., Wawer, I., & Paradowska, K. (2013). Antioxidant Properties of Medicinal Plants from Peru. *Food and Nutrition Sciences* , 4, 71-77.
10. Bermúdez Díaz, L., & Huamán Saavedra, J. (2015). Evaluación del efecto hipoglucemiante de *Gentianella bicolor* (Corpus huay), *Gentianella nitida* (Hercampuri) y *Gentianella chamuchui* (Genciana) en *Rattus rattus*. *Revista Ciencia y Tecnología* , 11 (2), 93 - 103.
11. Boyne, A. F., & Ellman, G. L. (1972). A Methodology for Analysis of Tissue Sulfhydryl Components. *Analytical Biochemistry* (46), 639 - 653.
12. Brand Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm- Wiss.u.- Technol* (28), 25 - 30.
13. Brunton, L., Chabner, B., & Knollman, B. (2012). *Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (12a ed.). MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
14. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods of Enzimology* , 52, 302 - 310.

15. Callo C, N., Lock, O. R., Alvarez, C. M., & Jurupe Ch, H. (2001). Xantonas y Actividad hipoglicemiante de *Gentianella nitida* y *G. tristicha*. *Boletín de la Sociedad Química del Perú* , 67 (3), 195-206.
16. Castillo, S., Salinas, N., León, B., & Sánchez, I. (2006). Gentianaceae endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología* , 13 (2), 339.
17. Corporación Andina de Fomento. (2012). *Hercampuri*. Recuperado el 2012, de <http://www.caf.com/attach/9/default/4CriteriosdeCoberturaGeogr%C3%A1fica>
18. Denzoin Vulcano, L. A., Soraci, A. L., & Tapia, M. O. (2013). Homeostasis del glutatión. *Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana* , 47 (3), 529-529.
19. Doroteo, V., Díaz, C., Terry, C., & Rojas, R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú* , 79 (1), 13-20.
20. Fabris, H. A. (1960). El genero *Gentianella* en Ecuador. *Boletin de la Sociedad Argentina de Botánica* , VIII (3 - 4), 160 - 165.
21. Gambini, B. J. (2007). Efecto del estradiol y otros compuestos estrogénicos sobre la expresión de genes asociados a la longevidad. Valencia, España.
22. Geissman, J. (1956). Absorption Spectra of metal complexes of flavonoid compounds. *The Journal of Organic Chemistry* , 21, 1395 - 1401.
23. Habig, H., & Jakoby, B. (1981). *Techniques in Free Radical Research*.
24. Hassan, H., & Yousef, M. (2010). Ameliorating effect of chicory (*Cichorium intybus* L.)-supplemented diet against nitrosamine precursors-induced liver injury and oxidative stress in male rats. *Food and Chemical Toxicology* , 48, 2163-2169.
25. Instituto Nacional de Salud. (s.f.). *Hercampuri_Vademecum*. Recuperado el 20 de 04 de 2012, de

http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/7/jer/censi_plant_indi/Hercampuri_Vademecum.pdf

26. Kawahara, N., Masuda, K., Sekita, S., & Satake, M. (2001). A New Secoiridoid Glucoside, Amaronitidin, from the Peruvian Folk Medicine "Hercampuri" (*Gentianella nitida*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* , 49 (6), 771-772.
27. Kawahara, N., Nozawa, M., Kurata, A., Hakamatsuka, T., Sekita, S., & Satake, M. (1999). A Novel Sesterterpenoid, Nitiol, as a Potent Enhancer of IL-2 Gene Expression in a Human T Cell Line, from the Peruvian Folk Medicine "Hercumpuri" (*Gentianella nitida*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* , 47 (9), 1344-1345.
28. Konigsberg Fainstein, M. (2008). *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno*. El Manual Moderno.
29. Lacaille Dubois, M. A., Galle, K., & Wagner, H. (1996). Secoiridoids and Xanthones from *Gentianella nitida*. *Planta Medica* , 62, 365-368.
30. Lock, O., Castillo, P., Doroteo, V., & Rojas, R. (2005). *Antioxidant activity in vitro of selected peruvian medicinal plants*. Recuperado el 04 de Abril de 2016, de International society for horticultural science: http://www.actahort.org/books/675/675_13.htm
31. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* (193), 265 - 275.
32. Maldonado Saavedra, O., Jimenez Vásquez, E. N., Guapillo Vargas, M., Ceballos Reyes, G., & Méndez Bolaina, E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico degenerativas. *Revisat Médica de la Universidad Veracruzana* , 34.

33. Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry* , 47, 469 - 474.
34. Martínez Sámano, J., Torres Durán, P. V., & Juárez Oropeza, M. A. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de Educación Bioquímica* , 30 (2), 56-67.
35. Mimica Dukic, N., Simin, N., Svirčev, E., Orčić, D., Beara, I., Lesjak, M., y otros. (2012). *INTECH*. Recuperado el 27 de 09 de 2016, de www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/the-effect-of-plant-secondary-metabolites-on-lipid-peroxidation-and-eicosanoid-pathway
36. Nikolova, M., Valyovska-Popova, N., Dimitrova, M., & Peev, D. (2014). High - mountain Bulgarian plants - free radical scavenging activity and flavonoid composition. *Journal of BioScience and Biotechnology* , 29-33.
37. Organizacion Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Recuperado el 25 de 01 de 2016, de http://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/
38. Orellana, M. b., & Guajardo, V. T. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile* , 132, 88.
39. Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., y otros. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of ageing and development* , 51 (3), 283-297.
40. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice - Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* , 26, 1231 - 1237.

41. Rojas, R., Doroteo, V., Bustamante, B., Bauer, J., & Lock, O. (2004). Antimicrobial and free radical scavenging activity of *Gentianella nitida*. *Fitoterapia*, 75 (7), 754-757.
42. Sandoval, M., Lazarte, K., & Arnao, I. (2008). Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera* L. (uva). *Anales de la Facultad de Medicina*, 69 (4), 250-259.
43. Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152 - 178.
44. Sisamón, I. (2003). Acerca de la Hepatotoxicidad del Paracetamol. *Revista del Hospital Privado de Comunidad*, 6 (2), 1-3.
45. Troncoso, L., & Guija, E. (2007). Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum*(perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. *Anales de la Facultad de Medicina*, 68 (4), 333-343.
46. Tuñón, M. J., Álvarez, M., Culebras, J. M., & González-Gallego, J. (2007). Modelos animales de fallo hepático fulminante. *Nutrición Hospitalaria*, 22 (2), 199-209.
47. Ugaz Soto, L., Zafra Tanaka, J., & Tapia Vicente, M. (2012). Efecto de *Gentianella alborosea* en esteatosis hepática no alcohólica inducida por dieta hiperlipídica en ratas Holtzman hembras. *Redalyc*, 17 (1), 18-23.
48. Villavicencio Vargas, O. (2001). Criterios de Aplicación clínica de las plantas medicinales. *Manual de Fitoterapia*, 347-392.
49. Voet, D., & Voet, J. G. (2004). Bioquímica. 3a edición, 496. Médica Panamericana.
50. You, Y., Yoo, S., Yoon, H. G., Park, J., Lee, Y. H., Kim, S., y otros. (2010). In vitro and in vivo hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum*

officinale (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* , 48, 1632-1637.

51. Zakaria Hamza, R., & Salem Al Harbi, M. (2015). Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and *Nigella sativa* extract supplements. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* , 5 (7), 521-53.

ANEXOS



Anexo 1. Planta Gentianella nitida.



Anexo 2. Raíz, tallo y flores de Gentianella nitida.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Integración Nacional y el reconocimiento de Nuestra Biodiversidad"

CONSTANCIA N° 188-USM-2012

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa), recibida de **Kelly Nora CARBONEL VILLANUEVA**, estudiante de Maestría en Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Gentianella nitida*** (Griseb.) Fabris y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: GENTIANALES

FAMILIA: GENTIANACEAE

GENERO: *Gentianella*

ESPECIE: *Gentianella nitida* (Griseb.) Fabris

Nombre vulgar: "Hercampuri"

Determinada por: Dra. Haydeé Montoya Terreros (Susy Castillo R.)

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 10 de Julio de 2012



Haydeé Montoya Terreros
Dra. Haydeé Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"

CONSTANCIA N° 26-2015-USM-MHN

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA
CONSTANCIA QUE:

La Srta. **Kelly Nora CARBONEL VILLANUEVA**, tesista de la maestría en Bioquímica
de la facultad de medicina la UNMSM, hace entrega de 1 material vegetal *Gentianella*
nitida, como parte de su trabajo.

La muestra fue numerada con el número.

- *Gentianella nitida* "hercampury": **USM 283720**

Se expide la presente, a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Lima, 17 de junio de 2015



[Firma]
Dra. HAYDEE MONTOYA-TERREROS
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Telfs. (511)471-0117, 470-4471
470-7918, 6197000 anexo 5703

e-mail: museohn@unmsm.edu.pe
<http://museohn.unmsm.edu.pe>

Anexo 4. Constancia de depósito del material vegetal.



Planta entera *Gentianella nitida*



Molienda de la planta



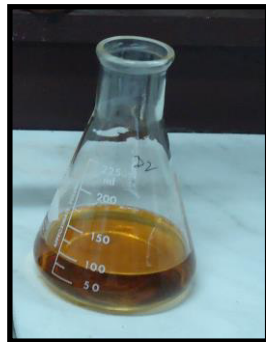
Cocción 15 min



Pos cocción

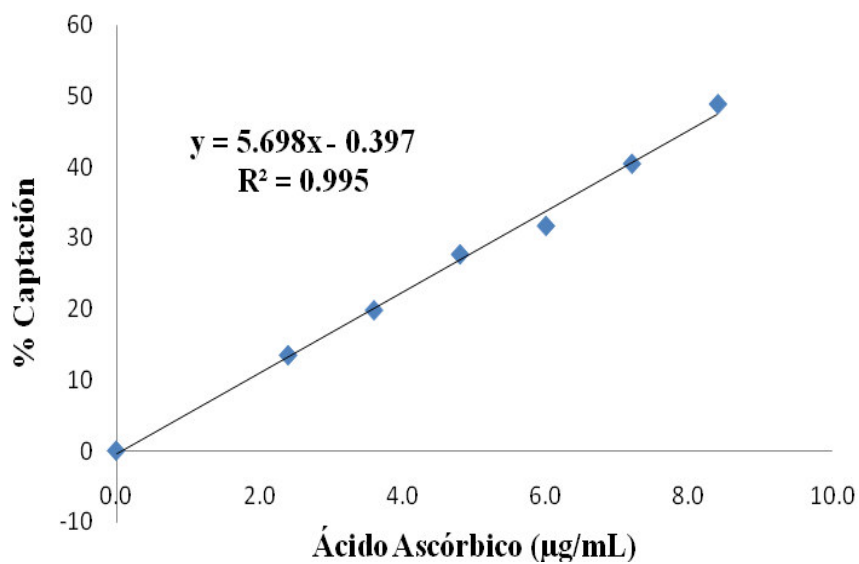


Filtración del extracto

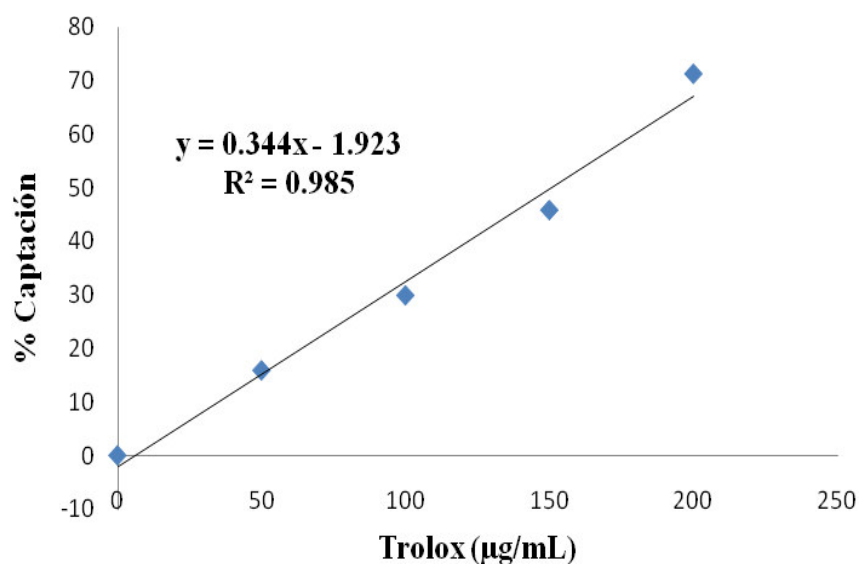


Extracto acuoso *Gentianella nitida*

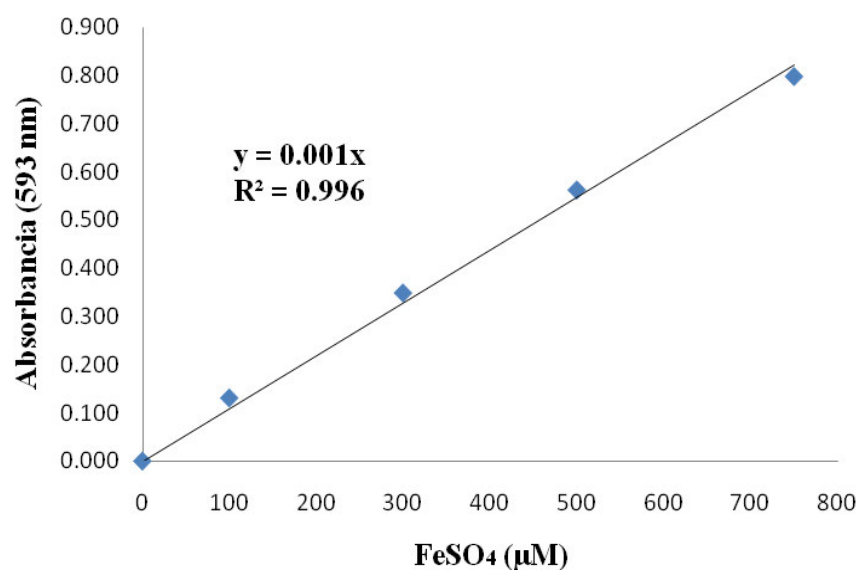
Anexo 5. Preparación del extracto acuoso de *Gentianella nitida*.



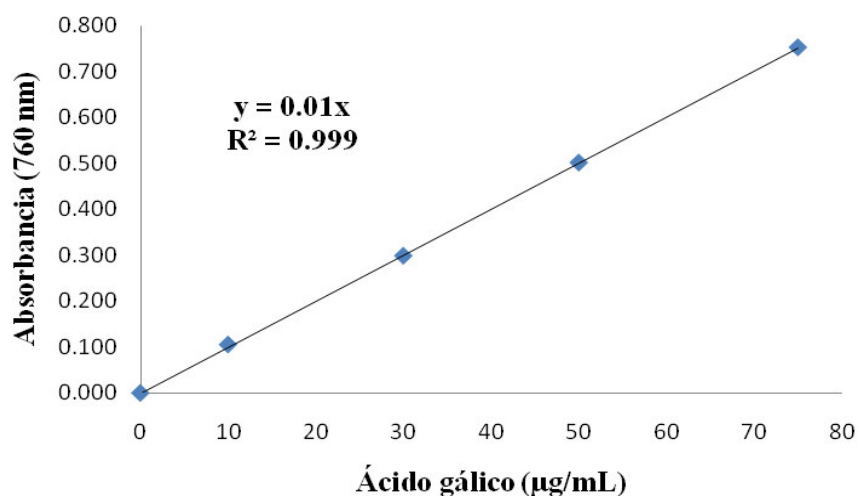
Anexo 6. Ácido ascórbico estándar en la curva de calibración en el método DPPH.



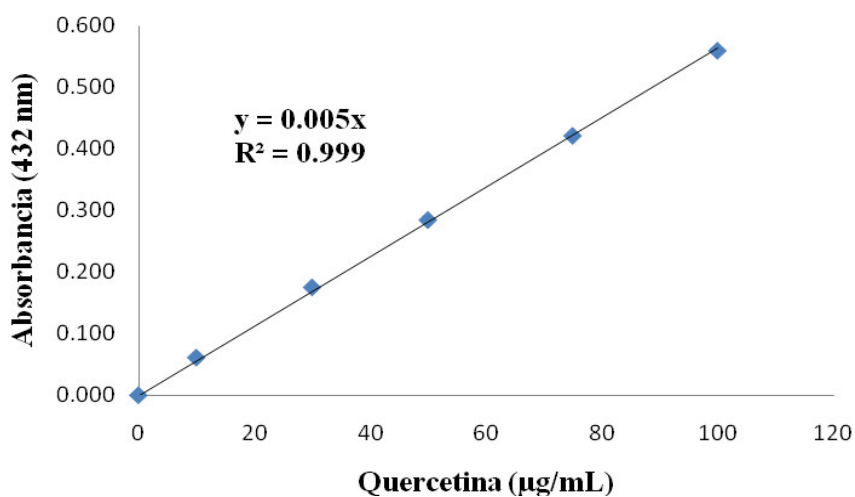
Anexo 7. Curva de calibración del Trolox en el método de ABTS.



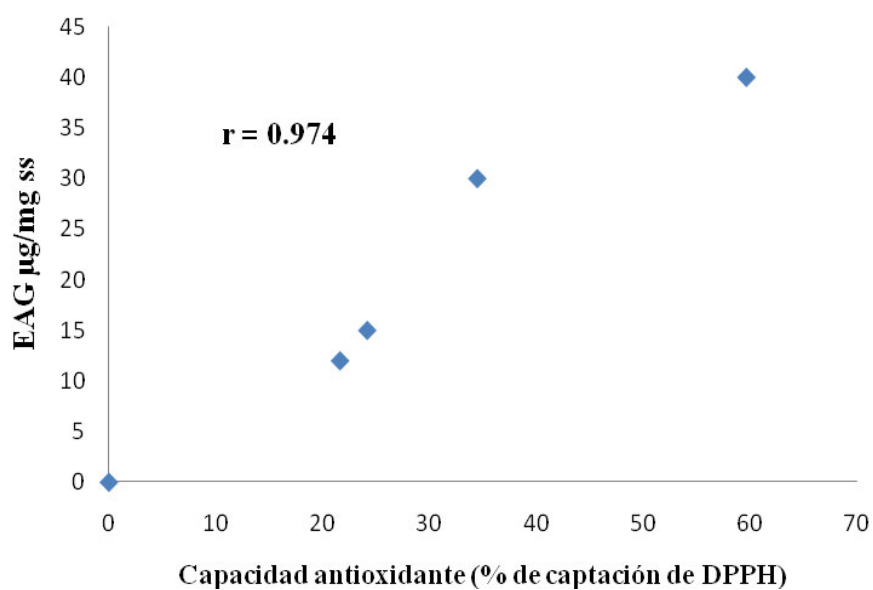
Anexo 8. Método de FRAP con la curva de calibración del FeSO₄.



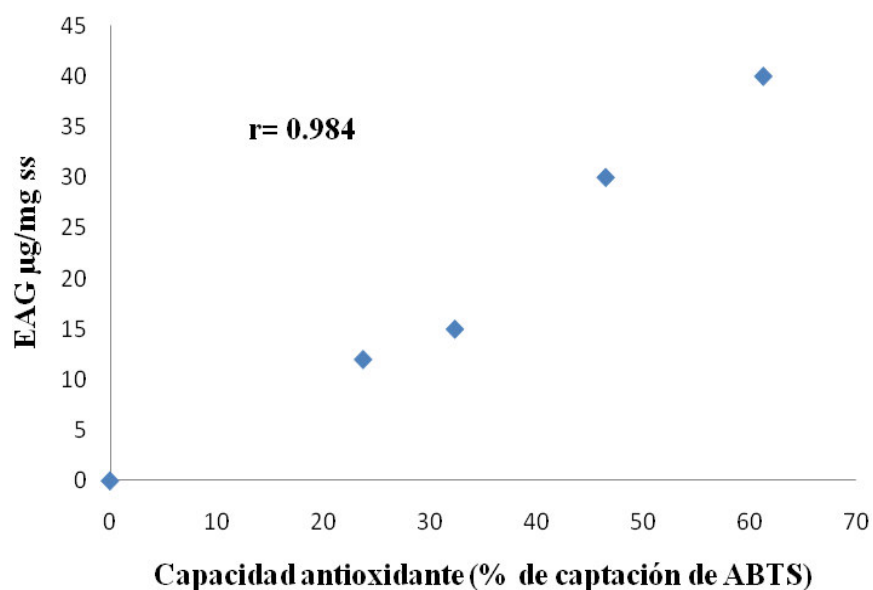
Anexo 9. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales con ácido gálico.



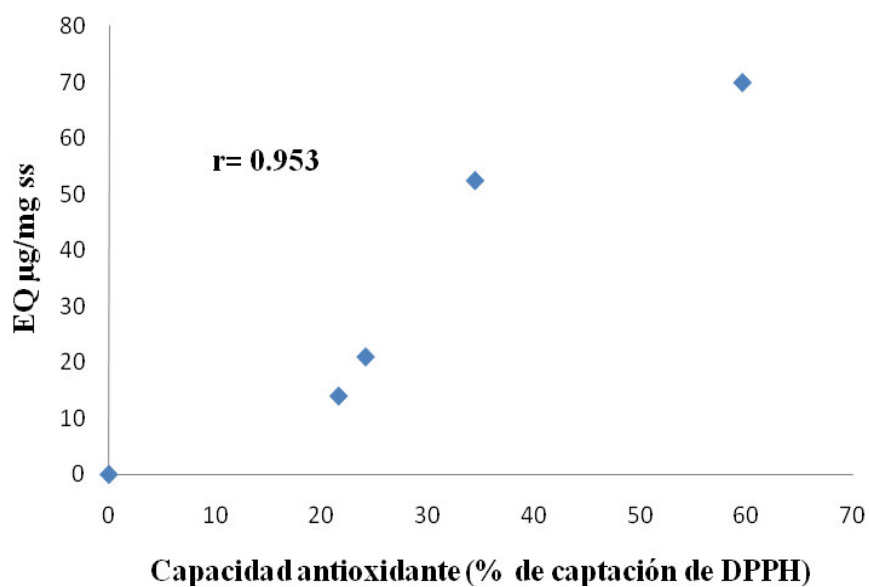
Anexo 10. Curva de calibración de quercetina para cuantificación de flavonoides.



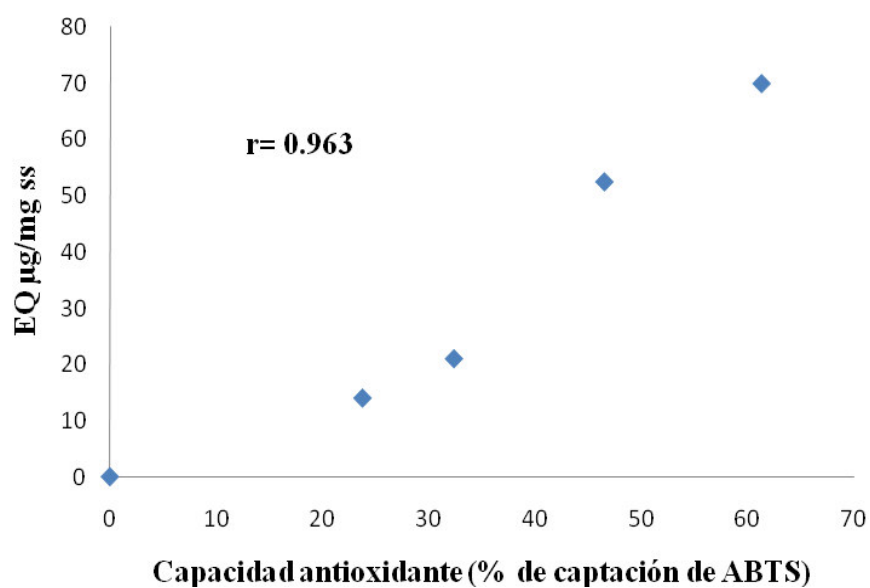
Anexo 11. Correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH.



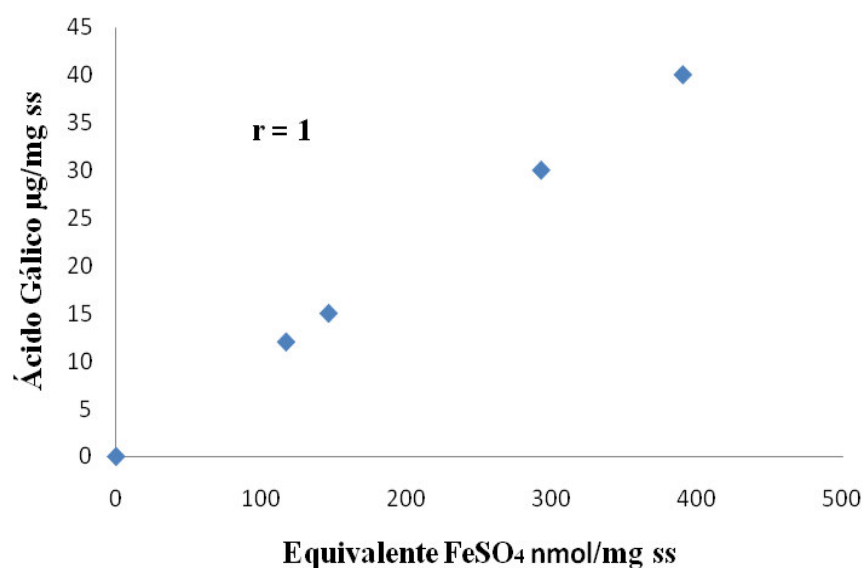
Anexo 12. Correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de ABTS.



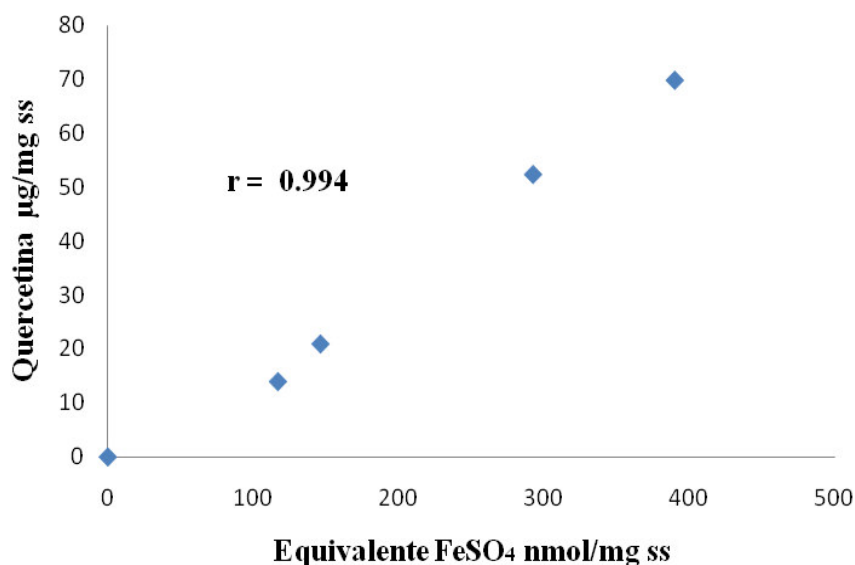
Anexo 13. El coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH.



Anexo 14. El coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de ABTS.



Anexo 15. Correlación de Pearson entre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de FRAP.



Anexo 16. El coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de FRAP.

Anexo 17. Determinación de la actividad específica de la superóxido dismutasa: diferencia entre las medianas por prueba Post hoc Mann Whitney.

Comparaciones múltiples entre grupos	p valor
Control - paracetamol	0,0209
Control - silimarina	0,0833
Control – <i>Gentianella nitida</i>	0,2482
Paracetamol - silimarina	0,0209
Paracetamol - <i>Gentianella nitida</i>	0,0433
Silimarina - <i>Gentianella nitida</i>	0,5637

Anexo 18. Determinación de la actividad específica de la Glutación S-transferasa: diferencia entre las medianas por prueba Post hoc Mann Whitney.

Comparaciones múltiples entre grupos	p valor
Control - paracetamol	0,0209
Control - silimarina	0,0209
Control – <i>Gentianella nitida</i>	0,5637
Paracetamol - silimarina	0,1489
Paracetamol - <i>Gentianella nitida</i>	0,0833
Silimarina - <i>Gentianella nitida</i>	0,0209

Anexo 19. Determinación de los niveles de glutación reducido: diferencia entre las medianas por prueba Post hoc Mann Whitney.

Comparaciones múltiples entre grupos	p valor
Control - paracetamol	0,0209
Control - silimarina	0,2482
Control – <i>Gentianella nitida</i>	0,0209
Paracetamol - silimarina	0,0209
Paracetamol - <i>Gentianella nitida</i>	0,2482
Silimarina - <i>Gentianella nitida</i>	0,0209

Anexo 20. Determinación de lipoperoxidación: diferencia entre las medianas por prueba Post hoc Mann Whitney.

Comparaciones múltiples entre grupos	p valor
Control - paracetamol	0,4678
Control - silimarina	0,0209
Control – <i>Gentianella nitida</i>	0,8817
Paracetamol - silimarina	0,0209
Paracetamol - <i>Gentianella nitida</i>	0,0759
Silimarina - <i>Gentianella nitida</i>	0,0180